

(22) 1999/12/30

(43) 2001/06/30

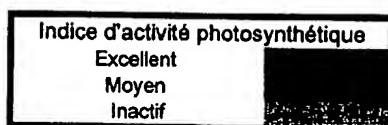
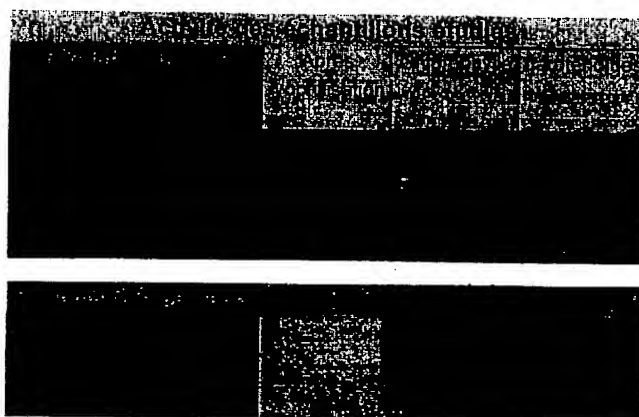
(72) PURCELL, MARC, CA

(71) PURECELL TECHNOLOGIES INC., CA

(51) Int. Cl.⁷ A61K 35/78, A61P 17/16, A61P 31/00

(54) **PROCEDE DE PREPARATION D'EXTRAITS DE PLANTES
ACTIFS ET UTILES A LA CAPTURE DE RADICAUX LIBRES;
LES EXTRAITS, ET COMPOSITIONS ET DISPOSITIFS LES
COMPRENANT**

(54) **PROCEDURE FOR PREPARING ACTIVE PLANT EXTRACTS
USED TO TRAP FREE RADICALS; THE EXTRACTS AND
COMPOUNDS AND DEVICES CONTAINING THEM**



(57) Cette invention concerne un procédé de préparation d'extraits de plantes, qui comprennent des pigments synthétiques dans leur environnement membranaire (membranes thylacoïdiennes). Ces extraits sont actifs ou activables. Les extraits peuvent être stabilisés en leur retirant rapidement leurs molécules d'eau, auquel cas on peut les conserver pendant plusieurs mois. Ils sont activables une fois réhydratés. Le procédé comprend une première étape de conditionnement lumineux de la plante, idéalement entre 500 et 600 nm pour garder les pigments dans leur état fondamental (non excités). Il comprend aussi une deuxième étape de dispersion mécanique des tissus de la plante dans un tampon permettant de garder associés les pigments dans leur environnement membranaire, en sélectionnant des paramètres de viscosité, fluidité, d'hypertonie, de température et de pH adéquats. Les membranes thylacoïdiennes sont ensuite soumises à une troisième étape de séparation du reste des constituants de la plante, ce qui conduit à l'obtention d'un gâteau, utilisable immédiatement ou à lyophiliser pour usage futur. Les extraits sont utiles entre autres pour la capture de radicaux libres, qui sont reliés à l'inflammation, au cancer ou aux irradiations, notamment dans l'ultra-violet.

TITRE DE L'INVENTION

Procédé de préparation d'extraits de plantes actifs et utiles à la capture de radicaux libres; les extraits, et compositions et dispositifs les comprenant.

DOMAINE DE L'INVENTION

- 5 Cette invention concerne la préparation de membranes thylacoïdiennes de plantes.

CONTEXTE DE L'INVENTION

- 10 La lumière communique aux organismes terrestres l'énergie dont ils ont besoin, mais les cellules ne peuvent ni stocker ni utiliser directement la lumière : celle-ci dit être transformée en énergie chimique, plus facilement utilisable. Or la plupart des réactions énergétiques, dans les cellules, équivalent généralement à des transferts d'électrons entre molécules. Les plantes sont donc capables d'extraire des électrons d'une substance omniprésente : l'eau. La production d'électrons à partir de l'eau n'est
- 15 pas une mince affaire pour la plante, car les molécules d'eau cèdent difficilement leurs électrons. Les cellules doivent utiliser l'énergie de quatre photons pour dissocier deux molécules d'eau et libérer quatre protons et quatre électrons.

- Chez les plantes supérieures, les réaction primaires de la photosynthèse ont lieu dans les membranes de vésicules appelées thylacoïdiennes, elles-même
- 20 présentes dans des organites cellulaires spécialisés, les chloroplastes. Par la photodissociation de l'eau, il y a production d'oxygène. L'oxygène ne se forme que dans le complexe de protéines et de pigments nommé le photosystème II (PSII), qui existe dans tous les organismes photosynthétiques producteurs d'oxygène : les cyanobactéries, les algues et les plantes supérieures. Le PSII joue essentiellement le
- 25 rôle d'un minuscule condensateur : il emmagasine l'énergie en séparant et en stabilisant les charges positives et négatives, de part et d'autre de la membrane thylacoïdienne. Plus précisément, les pigments spécialisés du PSII qui absorbent un photon utilisent efficacement cette énergie lumineuse pour créer et séparer des charges électriques.

- 30 La séparation des charges, à partir de l'énergie lumineuse, résulte d'un ensemble complexe de réactions assurées par des protéines. Dans le PSII, le transfert d'électrons s'effectue sur le « centre réactionnel », composé des deux grands polypeptides D1 et D2 et d'une protéine plus petite, le cytochrome b_{559} . Les

polypeptides D1 et D2 stabilisent les pigments et les transporteurs d'électrons du centre réactionnel. D'autres petits polypeptides sont associés au photosystème II, mais leurs fonctions restent principalement mécaniques. Plusieurs ions organiques ou minéraux comme le manganèse, le chlorure, le calcium, le fer et le carbonate catalysent le transfert des électrons, stabilisent la structure des protéines ou règlent l'activité du photosystème. Enfin plusieurs centaines de molécules de chlorophylles captent l'énergie solaire et la canalisent vers le centre réactionnel (figure 1). Les complexes photosynthétiques des bactéries et des végétaux sont très différents : les bactéries photosynthétiques ne produisent généralement pas d'oxygène et c'est un pigment particulier, la bactériochlorophylle, qui capte la lumière. La bactériochlorophylle absorbe la lumière à une longueur d'onde bien plus élevée que la chlorophylle, et son pouvoir oxydant est donc inférieur.

Dans le photosystème II, le système de transport d'électrons est formé de cinq composants : un pigment chlorophyllien, qui agit comme donneur primaire d'électrons quand un photon l'excite; un composé Z, donneur secondaire d'électrons, qui réduit la chlorophylle, c'est-à-dire lui rend un électron; la phéophytine, pigment qui accepte l'électron de la chlorophylle; la plastoquinone Q_A , qui accepte l'électron de la phéophytine, et enfin la quinone Q_B , qui accepte des électrons de la plastoquinone Q_A .

Le pigment chlorophyllien du centre réactionnel semble comporter une paire spéciale de chlorophylles, qui semblent chimiquement identiques aux pigments chlorophylliens photocollecteurs, mais ont une fonction différente. On le désigne par P680, car il absorbe surtout la lumière à une longueur d'onde de 680 nanomètre.

Au cours de la photosynthèse, les pigments de l'antenne chlorophyllienne absorbent un photon et canalisent son énergie vers P680, dans le centre réactionnel. Ce dernier transforme l'énergie du photon en énergie potentielle, associée à une séparation de charges électriques : un électron du P680 passe rapidement à une molécule voisine de phéophytine : cette molécule porte alors une charge négative, et P680 une charge positive. La séparation des charges augmente quand, successivement, la phéophytine transmet son électron excédentaire à la plastoquinone Q_A , la tyrosine Z donne un électrons à P680*, et la plastoquinone Q_A transmet l'électron qu'elle a reçu à la quinone Q_B . Ces transferts de charge sont très rapides : le transfert initial d'un électron entre P680 activé et la phéophytine dure moins de 10^{-12} seconde. Par étapes successives, les charges positives et négatives se séparent ainsi progressivement. Le cycle de transfert d'électrons s'achève lorsque tous les

composants du PSII redeviennent électriquement neutres, prêts à recommencer un nouveau cycle.

À la face externe de la membrane photosynthétique, la régénération de la quinone Q_b est simple : quand celle-ci a acquis deux électrons, après deux cycles, elle capte deux protons et quitte le PSII, remplacée par un quinone Q_b neutre. Les électrons et les protons de la quinone doublement réduite passent alors à un autre complexe photosynthétique. Les protons libérés sur la face interne de la membrane thylacoïdienne servent notamment à synthétiser l'adénine triphosphate (ATP).

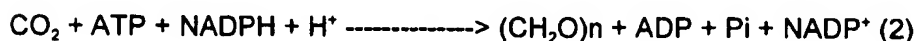
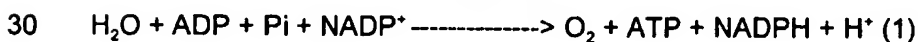
À la surface interne de la membrane, la tyrosine Z^+ se régénère (se réduit à nouveau) beaucoup plus difficilement : elle doit prendre un électron à une substance oxydable, présente dans l'environnement de la cellule, comme les ions organiques (tels que l'ion acétate, l'ion malate et l'ion succinate) et des composés minéraux simples (tels que les ions sulfures et thiosulfates). Ces ions sont également ceux qui procurent des électrons aux bactéries photosynthétiques ne produisant pas d'oxygène.

L'eau, bien plus abondante que tous les ions, représente une source d'électrons plus riche. Cependant $P680^+$ n'est pas capable d'arracher des électrons aux molécules d'eau, car son pouvoir oxydant est trop faible : la réaction d'oxydation de l'eau libère simultanément quatre électrons, tandis que le $P680^+$ ne peut accepter qu'un seul électron à la fois. Il y a donc un site catalytique de l'eau, du côté luménal du chloroplaste formé principalement de trois protéines extrinsèques, de chlore et de manganèse, mais que nous verrons pas dans le présent document.

Par la plastocyanine, les électrons du PSII sont transférés au complexe des cytochromes b_6 et f , pour s'acheminer vers le photosystème I. Ce dernier système s'apparente beaucoup au PSII, c'est pourquoi je ne m'attarderai pas sur cet aspect. Les électrons sont finalement acheminés vers le facteur de couplage afin de réduire le NADPH et ainsi produire l'ATP, qui servira à la fabrication des sucres.

Donc, la photosynthèse comprend deux processus fondamentaux que l'on peut résumer par les deux réactions partielles suivantes:

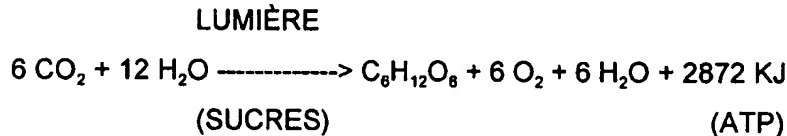
LUMIÈRE



Au cours de la première réaction en phase lumineuse, des protons sont puisés dans l'eau du chloroplaste pour produire de l'ATP. La deuxième réaction consiste en l'utilisation du NADPH et de l'ATP dans une série de réactions qui mènent à la réduction de l'anhydride carbonique gazeux en glucides, principalement de l'amidon. Ces deux réactions se produisent simultanément; à mesure que les produits formés par le processus (1) sont investis dans la mise en marche des réactions du processus (2).

Le bilan global de la photosynthèse, résumé par l'équation suivante, est la production de sucres principalement sous forme d'amidon et d'énergie sous forme d'ATP:

10



A première vue, l'équation brute de la photosynthèse peut sembler relativement simple, mais elle ne donne qu'une représentation schématique et approximative du déroulement réel de ce processus auquel participent de nombreuses autres réactions isolées. La photosynthèse est un processus complexe basé sur le transport d'électrons à travers de nombreuses réactions biochimiques. Certaines d'entre elles sont des réactions lumineuses, tandis que d'autres se déroulent à l'obscurité, mais toutes ont leur fonction propre à la synthèse des différents complexes moléculaires essentiels à la vie animale.

20

Les complexes pigments/protéines et les pigments photosynthétiques

Il importe de connaître précisément les pigments que l'on est susceptible de retrouver dans nos extraits. Pour ce faire, la présente section a pour but d'identifier et de mieux connaître les groupes de pigments photosynthétiques et surtout leur emplacement respectif dans la membrane thylacoïdienne.

25

Les couleurs rencontrées chez les plantes sont dues à la présence et à l'accumulation de pigments. Une substance est un pigment si elle absorbe sélectivement une partie de la lumière visible. Les fonctions chimiques responsables de l'absorption de la lumière sont appelées **chromophores** (étymologiquement: porteuses de couleur). Elles sont constituées de liaisons chimiques riches en électrons délocalisés ou encore de la conjugaison de ces liaisons. Des groupements chimiques

30

comme le groupe hydroxyle (-OH) ou méthoxy (-OCH₃) amplifient ou modifient la couleur de base donné par le chromophore. Ces groupements sont appelés **auxochromes** (étymologiquement: amplificateurs de couleurs). L'effet **bathychrome** correspond à une modification de la structure moléculaire (l'addition de groupements chimiques) ayant pour effet de déplacer la couleur vers le rouge. Inversement, l'effet **hypsochrome** correspond à une modification structurale qui déplace l'absorption de la molécule vers les longueurs d'ondes plus courtes.

Les photons qui parviennent aux thylacoïdiennes sont captés initialement par les antennes de pigments (LHC) du PSII.

L'antenne collectrice de lumière du photosystème II (LHCII) joue un rôle de premier plan au niveau de l'empilement des thylacoïdiennes ainsi que sur la distribution d'énergie entre les photosystèmes (Allen et al., 1981; Day et al., 1984; Werst et al., 1992). Le LHC-II contient environ 40% des protéines des thylacoïdiennes et 50% de la chlorophylle totale (Plumley et Schmidt, 1987). Les photons sont entraînés jusqu'au centre du PSI via le LHC-I. De là, les électrons parviennent au P-700 (via le complexe des cytochromes b₆/f), qui est excité par la lumière déjà captée par les pigments du LHC-I.

Sachant que la composition en pigments des antennes est grandement influencée par l'intensité lumineuse (Takaichi et al., 1992), l'étude des pigments revêt un aspect fondamental.

Le premier pas dans la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique s'effectue au niveau des centres réactionnels, lesquels représentent une petite fraction du contenu total en pigments. Sous une forte illumination, une excitation directe des centres réactionnels est possible mais c'est un événement très rare; dans la majorité des cas, la lumière est assemblée par la masse de pigments. Ces pigments transfèrent l'énergie d'excitation aux centres réactionnels qui convertissent ces états d'énergie excitée en séparation de charges "stables". L'énergie migre à travers un enchevêtrement de pigments jusqu'à ce qu'elle soit capturée, et ce, si elle n'est pas émise en fluorescence (émission de photons) ou dissipée en chaleur.

Ces réactions coexistent simultanément avec la capture de l'énergie d'excitation représentant une perte de l'utilisation photosynthétique de l'énergie lumineuse. D'où il appert que l'efficacité du premier pas de la conversion de l'énergie photosynthétique dépend fortement de la **structure moléculaire** des membranes thylacoïdiennes, des complexes pigments-protéines et des centres réactionnels. L'architecture de ces unités

détermine les conditions de migration de l'énergie, de la séparation de charges et la stabilisation des charges (Garab et al., 1987).

On peut diviser les pigments photosynthétiques en deux ou trois groupes: les **chlorophylles**, les **caroténoïdes** et les **phéophytines**.

5

Les chlorophylles

D'après les expériences sur la sédimentation des complexes Chl-protéines en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS), les chlorophylles-a et -b seraient liées aux protéines (Smith et Pickels, 1941; Green et al., 1991). Elles peuvent donc être
10 extraites avec un mélange de solvant polaire (chlorophorme-méthanol, acétone-eau), ce qui démontre qu'elles ne sont pas liées de façon covalente. Les chlorophylles-a et -b possèdent une chaîne phytyl, laquelle est estérifiée au groupe carboxyl de l'anneau, leur donnant ainsi leur caractère lipidique (Lichtenthaler, 1987). Ces chlorophylles constituent, chez les plantes supérieures et les algues, environ 20% des lipides totaux.

15 **Les caroténoïdes**

Le terme caroténoïde a été créé par l'Allemand Wackenroder, en 1830, afin de désigner le pigment de la carotte. Aujourd'hui, on rassemble sous cette appellation un ensemble d'hydrocarbures dont la charpente moléculaire est formée de huit unités de
20 cinq atomes de carbone (tétraterpène). Depuis le début des années 80, une recrudescence de la recherche sur ces pigments a été notée. Ceci n'est pas sans répercussion avec l'annonce à grand éclat, que la consommation des caroténoïdes contenus dans les fruits et légumes, a été associée à une baisse de l'incidence de plusieurs types de cancers (Peto et al., 1981).

Il existe deux types de caroténoïdes: les **carotènes** et les **xanthophylles**, qui
25 se différencient principalement par l'absence ou la présence d'oxygène.

De façon générale, les caroténoïdes transfèrent l'énergie aux autres pigments, et avec une très grande efficacité, qui est préférentiellement captée par les chlorophylles. Cette énergie est saisie au niveau du centre réactionnel. Cette efficacité réside probablement dans le fait que les caroténoïdes se retrouvent des deux côtés de la
30 membrane thylacoïdienne (Picorel et al., 1992), contrairement à ce qui est proposé lors de précédentes études chez les membranes photosynthétiques bactériennes, et qui démontraient la présence de caroténoïdes principalement du côté du cytoplasme (Picorel et al., 1988). Comme nous le verrons plus loin, l'état d'excitation des

caroténoïdes est idéal tant dans son rôle d'antenne que de celui de photoprotection: ces pigments (comme pour toutes les molécules) ont leurs états singulets plus élevés en énergie et leur états triplets plus bas que les états correspondants chez les chlorophylles (Frank et al., 1991; Mimuro et Katoh, 1991).

Les caroténoïdes, en se liant au L.H.C., prennent une configuration "tout-trans" (Iwata et al., 1985), tandis qu'une liaison au centre réactionnel leur confère une conformation *cis* (Lutz et al., 1976; Koyama, 1990). Pour une revue des structures et des fonctions des caroténoïdes, voir les articles de Koyama 1991, Frank et al., 1992, 1993 (chez les bactéries) et de Gillbro et al. en 1993 (Voir aussi sur le transfert d'énergie entre les caroténoïdes et les chlorophylles: Frank et al. 1992, 1993 et Owens et al., 1992)

i) Les carotènes (sans oxygène)

Il existe deux isomères de la carotène: α -carotène

β -carotène

Les α -carotènes se présentent habituellement sous forme de trace chez les thylacoïdiennes. Par contre la β -carotène est très abondante surtout au niveau des centres réactionnels. Cet isomère est même orienté avec le P-700 (Schrafferricht et Junge, 1981). Il serait partiellement impliqué dans l'absorption de la lumière, mais son rôle principal constituerait à protéger la Chl-a de la photooxydation dans ou près du centre réactionnel (Lichtenthaler, 1987).

ii) Les xanthophylles (non polaire avec oxygène)

A l'exception de la violaxanthine qui est aussi liée à l'enveloppe chloroplastique, toutes les autres sont liées à la membrane thylacoïdienne (Lichtenthaler et al., 1981). La lutéine, la violaxanthine et la néoxanthine sont les xanthophylles les plus abondants chez les plantes supérieures (Thorner, 1975; Braumann et al., 1982; Kolubayev et al., 1985; Lichtenthaler, 1987). Par contre, une dé-époxydation de la violaxanthine nous donne spontanément la zéaxanthine:

Violaxanthine \rightarrow Anthéranthine \rightarrow Zéaxanthine

(Yamamoto, 1979; Grumbach, 1983)

En somme, les caroténoïdes sont connues pour participer à l'assemblage des unités actives du PSII (Humbeck et al., 1989) et du PSI; mais surtout pour jouer un rôle de protection des chlorophylles (Aronoff et MacKinney, 1943; Pepkowitz, 1943; Sistrom et al., 1956; Anderson et Robertson, 1960; Foote, 1976; Krinsky, 1979; Siefermann-Harms, 1987; Sandmann et al., 1993).

Une des preuves les plus probantes pour appuyer cette hypothèse nous provient des mutants dépourvus en caroténoïdes: ils ne peuvent survivre qu'en laboratoire et dans des conditions très spécifiques de température, d'oxygène... (Sistrom et al., 1956; Bilger et Bjorkman, 1990). L'irradiation aux UV-C occasionne une augmentation en caroténoïdes, ce qui renforce l'hypothèse de protection de la chlorophylle. Les caroténoïdes seraient donc un bon indice du stress infligé aux plantes (Campos et al., 1991). Elles sont également présentes en grande quantité (environ 2 µg/mg de protéine) dans l'enveloppe chloroplastique (Markwell et al., 1992).

Les phéophytines

En fait se sont des chlorophylles-a et -b qui ont subi une transformation (phéophylinisation), ce qui a occasionné une diminution du poids moléculaire de 22.3 par rapport aux chlorophylles, pour ainsi nous donner 871.18 et 885.16 respectivement

Plusieurs conditions peuvent causer une phéophylinisation:

- augmentation de l'acidité (fumigation SO₂, NO₂...)
- tissu sénescence
- **stress lumineux ou calorifique**
- plantes traitées aux herbicides
- temps d'entreposage du matériel photosynthétique

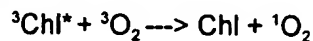
La distribution des pigments photosynthétiques dans le thylacoïdienne

L'intensité lumineuse, comme la qualité lumineuse, induit des changements chez les photosystèmes I et II des cyanophytes et des plantes vasculaires (Powles, 1984). La photoinactivation du photosystème II requiert seulement de la lumière (Kok et al., 1965), tandis que le photosystème I requiert de la lumière et de l'oxygène (Sato 1970a, b, c). Ainsi, l'orientation du chloroplaste contribue pour une importante part dans l'efficacité de la distribution du flux photonique au niveau des thylacoïdiennes.

Le rapport PSI/PSII devient plus élevé en présence d'une intensité lumineuse faible, et plus bas avec une forte intensité. Les travaux des auteurs cités précédemment, suggèrent que les changements du rapport PSI/PSII induits par la qualité et l'intensité lumineuse sont accomplis par un mécanisme commun pour le contrôle de la synthèse ou l'assemblage du complexe du PSI. Cette hypothèse a été vérifiée ultérieurement par le même groupe pour ainsi en faire ressortir les grandes lignes: 1° les changements d'intensités lumineuses résultent en la régulation de l'assemblage du PSI de façon similaire à la régulation en réponse à la qualité lumineuse, 2° la régulation est en corrélation avec le transport d'électrons au niveau

du complexe du cytochrome b₆/f, et non avec le bassin de plastoquinones (Murakami et Fujita, 1991). Donc à forte illumination, le taux P-680/P-700 est d'environ 2, par contre à faible illumination ce taux augmente à 4; ce qui suggérerait que le PSII serait impliqué dans un mécanisme de prévention à la surexcitation du PSI (Wilhelm et al., 1989).

5 Tout le monde s'entend sur le fait que la lumière à forte intensité détruit des molécules de chlorophylles (Asada et Takahashi, 1987; Siefermann-Harms, 1990; Miller et Carpentier, 1991). Par contre des résultats contradictoires affirment que ce traitement **n'affecte pas** la quantité de protéines totales (Sagar et Briggs, 1990) ou encore **diminue** cette quantité (Nurmi, 1990). Par contre, il est généralement accepté
 10 que le photoblanchiment de la chlorophylle survient lorsque le transfert d'énergie de la chlorophylle à l'état triplet (³Chl*) vers une caroténoïde est supprimé. En ces circonstances, un oxygène à l'état singulet (¹O₂) est produit, lequel est impliqué dans la dégradation de la chlorophylle:



15 $^1\text{O}_2 + \text{Chl} \longrightarrow \text{produit de dégradation}$

(Asada et Takahashi, 1987; Egorov et Krasnovsky, 1992)

Les caroténoïdes sont d'excellents "quencher" de ³Chl* et d' ¹O₂ (Foots et al., 1970; Grams et Eskins, 1972, Monger et Parson, 1977; Mathis et al., 1979; Kramer et Mathis, 1980). Donc l'efficacité du "quenching" dépend significativement de la
 20 **distance** entre chlorophylles et caroténoïdes et de leur orientation mutuelle (Moore et al., 1982). Par contre une augmentation de température cause une inactivation de tous les enzymes thermolabiles, ce qui pourrait, en ces conditions, produire de l'oxygène (O₂⁻, O₂²⁻, ¹O₂); Wieckowski et Majewska, 1990).

Par contre si on prend le cas du LHC-II, les caroténoïdes ne suffiraient que
 25 partiellement à la tâche de protection des chlorophylles. Le réel mécanisme impliquerait l'apoprotéine du LHC-II qui agirait comme barrière pour l'O₂, donc protégeant les pigments des dommages causés par la photooxydation (Siefermann-Harms, 1990).

Dualisme pigmentaire : antenne collectrice de lumière ou photoprotection?

30 Cette section a pour objectif premier de faire une récapitulation des travaux et résultats obtenus antérieurement (...et dont une grande majorité ne sont pas publiés) et cela en considérant la littérature comme point de repère. Les pigments scrutés à la

loupe ont des fonctions spécifiques en relation avec leur environnement immédiat et leur emplacement tridimensionnel.

Flux photonique

Les chlorophylles, principalement la chlorophylle-a, sont reconnues pour être d'excellents capteurs de photons, et ainsi initier le transfert énergétique jusqu'au centre réactionnel (voir l'introduction). Par contre le jeu subtil qu'elles entretiennent avec les caroténoïdes est particulièrement obscur.

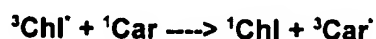
Nous aurons l'occasion de revenir sur l'implication des chlorophylles, mais pour bien comprendre les interactions de la masse pigmentaire, il est primordial de bien suivre les **caroténoïdes** et de comprendre les rôles respectifs de ceux-ci en fonction de leur organisation. Nous commencerons cette section par une brève incursion au niveau de la fonction d'antenne collectrice de lumière par les pigments. Par la suite, nous appliquerons ces notions dans le but d'introduire la fonction la plus représentative des caroténoïdes: la photoprotection.

La lumière peut être considérée de nature ondulatoire ou particulaire. La nature particulaire de la lumière est exprimée en quanta ou **photons**: ce sont des paquets d'énergie dont chacun a une longueur d'onde spécifique. L'énergie de chaque photon est inversement proportionnelle à la longueur d'onde. Une molécule (pigment) ne peut donc absorber qu'un photon à la fois, et ce photon ne peut exciter qu'un seul électron.

L'électron dans son **état fondamental**, peut être excité à une distance correspondant à l'énergie exactement égale à l'énergie d'un photon absorbé. Le pigment est maintenant dans un état **excité** (singulet ou triplet), et l'énergie d'excitation est utilisée lors du processus de la photosynthèse (**figure 2**; modèle simplifié du transfert énergétique (excitation et dé-excitation; Salisbury et Ross, 1992).

Les caroténoïdes ne sont pas seulement impliqués dans l'assemblage (Senger et Straßberger, 1978; Braumann et al., 1984; Humbeck et al., 1989) des photosystèmes, mais aussi comme **photoprotecteurs** et comme **antenne collectrice de lumière**, comme nous le verrons dans les lignes qui suivent.

La fonction de photoprotection des caroténoïdes inclut le transfert d'énergie de la Chl dans son état triplet (^3Chl) vers une caroténoïde dans son état fondamental (^1Car), et la dissipation de l'énergie à travers une relaxation non-radiative de la caroténoïde résultante (^3Car) (Krinski, 1979; Cogdell, 1985; Siefertmann-Harms, 1987; Frank et al., 1991; Mimuro et Katoh, 1991; Young, 1991):



$^3\text{Car} \longrightarrow ^1\text{Car} + \text{chaleur}$

Le "quenching" de la ^3Chl prévient la génération de l'oxygène singulet et des superoxydes (qui sont produits par l'accumulation de l'excès d'énergie) en favorisant la ^3Car (Mathis et Schenck, 1982), cette fonction est particulière aux caroténoïdes (Koyama, 1991). L'oxygène singulet et les superoxydes sont formés du côté réducteur du PSI. Une grande quantité est convertie en peroxyde d'hydrogène et en oxygène par la superoxyde dismutase (Takahashi et Asada, 1988). La fonction principale de ces pigments associés au centre réactionnel est d'accepter l'énergie (triplet) des chlorophylles, et de la dissiper en chaleur.

Il est connu que la présence de β -carotène au sein du centre réactionnel, facilite le transfert d'énergie $^3\text{Chl} \rightarrow ^1\beta\text{-carotène}$. Ce phénomène protège grandement la chlorophylle-a et -b du LHC-I. En absence de l'antenne collectrice de lumière (ou lorsque l'excès de lumière est tel, que les pigments périphériques du centre réactionnel prennent la relève), la Chl-a n'est pas protégée et se dégrade de façon graduelle (Purcell, M; thèse de doctorat). Ce phénomène peut s'expliquer de deux manières: 1° soit que la β -carotène ne participe pas au transfert d'énergie due au manque d'affinité de l'état d'énergie des Chl, ou 2° soit que la β -carotène serve d'antenne, au même titre que la Chl et les xanthophylles de l'antenne, et de cette façon, ce pigment n'est jamais en bout de chaîne énergétique. Cette dernière affirmation corrobore davantage avec les hypothèses mentionnées dans la littérature, et confirme la grande versatilité de ce pigment.

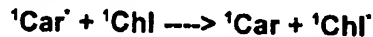
Il y aurait trois chemins pour générer la ^3Car : 1° la recombinaison de charges dans le centre réactionnel, 2° l'homofission (singulet) entre les caroténoïdes et 3° le transfert énergétique (triplet) d'une Chl vers une Car chez les LHC. Les chemins 2° et 3° indiquent un rapport étroit (proximité) entre les caroténoïdes (Car-Car) et les chlorophylles (Chl-Chl) chez les LHC (Kingma et al., 1985a et b). L'homofission a d'ailleurs été révélée dans plusieurs cas de caroténoïdes (Nuijs et al., 1985; Hayashi et al., 1990; Naruse et al., 1991). Et donc, le transfert énergétique entre caroténoïdes s'effectue dans l'ordre de la femtoseconde (Owens et al., 1992), ce qui pourrait expliquer la versatilité de ce type de pigment.

Nous proposons ici un résumé des résultats de travaux antérieurs qui nous permettra de mieux comprendre le fondement des caractéristiques que nous voulons préserver des différents extraits :

- 1° Le coeur du centre réactionnel du PSI est très dépouillé en pigment, mais le contenu en Chl-a est de plus en plus important quand on approche du P-700 (69.8 %). Ce qu'on constate en observant la photodégradation de ce complexe, c'est la grande sensibilité de la Chl-a (altération), sachant que les quantités sont les mêmes (en valeurs absolues) que dans les complexes de 200 chlorophylles et 100 chlorophylles par centre réactionnel. De plus, pour la première fois dans cette étude, on observe la formation d'un produit secondaire à la Chl-a survenant lors de sa détérioration.
- 2° La **néoxanthine** et la **violaxanthine** sont probablement associés au transfert indirect (ou direct ?) au P-700 (centre réactionnel du PSI) puisque la population périphérique est très affectée par la lumière.
- 3° La **β -carotène** semble confirmer son rôle d'antenne et de photoprotection. Dans ce cas, peu de xanthophylles peuvent pallier cette dernière fonction, puisqu'ils sont trop près du centre réactionnel. Par contre, si on additionne la quantité (en pourcentage) de dégradation secondaire, la valeur totale de photoblanchiment de la β -carotène est minimisée.
- 4° Pour chaque extrait membranaire, la **lutéine** est bien représentée, et semble avoir une vocation inflexible de collecteur de photons... Par ce fait, ce pigment pourrait être le lien électronique entre l'antenne (LHC-I) et le complexe que Gillbro et ses collaborateurs (1993) mentionnaient.
- 5° Le pigment le mieux connu, faisant partie du processus de photoprotection est la **zeaxanthine**. A forte illumination, l'appareil photosynthétique dé-époxyde la violaxanthine via l'anthéroxanthine, en zeaxanthine (Siefermann-Harms, 1977; Yamamoto, 1979; Hager, 1980; Bilger et al. 1989; Bilger et Björkman, 1990; Demmig-Adams, 1990). A l'obscurité ou à faible intensité lumineuse, la réaction inverse prend place (Demmig-Adams et al., 1987, 1990; Bilger et al. 1989).
- 6° En s'appuyant sur les travaux de Siefermann-Harms, le produit de dégradation adjacent à la lutéine dans les complexes dépourvus en antenne collectrice de lumière, serait de la **zeaxanthine** provenant de la dégradation de la violaxanthine. Dans une même lancée, lorsque les moyens échapatoires aux fortes illuminations sont restreints, la Chl-a se dégrade en phéophytine-a, et cela dans une proportion importante; mais ce pigment est rapidement dégradé à son tour (Siefermann-Harms, 1988; Maeda et Watanabe, 1992).

La fonction d'antenne collectrice de lumière chez les caroténoïdes, se produit lorsqu'il y a absorption de l'énergie lumineuse par une ¹Car pour générer un

état d'excitation singulet ^1Car , et puis le transfert d'énergie à une Chl dans son état fondamental (Larkum et Barrett, 1983; Siefermann-Harms, 1985; Owens et al., 1992):



5 Les caroténoïdes peuvent donc servir d'antenne collectrice de lumière dans les régions où la Chl n'est pas très efficace (Wasielewski et al., 1986; Trautman et al., 1990).

- 7° Les Chl-b absorbent l'énergie au sein du LHC-I, et la retransmettent aux Chl-a ou aux Car de façon très efficace.
- 10 8° Quoique faiblement représentée dans l'antenne de pigment, la **violaxanthine** est la plus durement touchée. En observant ce pigment exclusivement dans le centre réactionnel, on constate une altération moins prononcée, indiquant qu'elle participe à l'absorption directe des photons dans le LHC-I. Ce pigment est d'ailleurs le seul à se photodégrader en une forme.
- 15 9° Les deux autres xanthophylles (néoxanthine et lutéine) présentes sont beaucoup plus résistants que la violaxanthine.
- 10° L'altération de la néoxanthine est principalement localisé au niveau du centre réactionnel, et donc qu'il ne participerait que de façon accessoire à l'absorption des photons au niveau de l'antenne.
- 20 11° Le comportement de la **β -carotène** dans le centre réactionnel, est spectaculaire. Quoiqu'elle constitue une grande proportion des pigments entourant le centre réactionnel, elle n'est aucunement affectée par l'illumination. On constate clairement que la **β -carotène** joue un rôle très différent, qu'elle soit logée dans l'antenne ou au coeur du complexe.
- 25 12° Dès caroténoïdes, il semble que les **lutéines** et les **β -carotènes** sont ceux qui démontrent la plus grande affinité à l'absorption lumineuse de façon accessoire.

L'efficacité du transfert énergétique de façon générale ($\text{Car} \rightarrow \text{Chl}$), est très variable, quoique très rapide: de $3 \text{ ps} \pm 1$ (Gillbro et al., 1988) et 3.8 ps (Shreve et al., 1991). Plusieurs points peuvent être émis pour expliquer cette variabilité: 1° la

30 proximité (essentiellement des liaisons de van der Waals) entre les caroténoïdes (donneurs) et les chlorophylles (accepteurs), 2° un bon chevauchement spectral entre l'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur pour ainsi conserver l'énergie du processus de transfert et 3° une faible capacité de conversion interne ($S_1 \rightarrow S_0$) chez

les caroténoïdes (Cogdell et Frank, 1987; Frank et al., 1992). Dans cette même optique, les dernières années ont été prolifiques dans l'élucidation de la spécificité hypothétique des caroténoïdes via leur emplacement dans le complexe membranaire. Les études ont porté principalement sur la conformation des pigments. Les caroténoïdes garderaient une conformation **tout-trans** dans les LHC, d'où l'association
 5 avec la fonction de collecteur de lumière (Iwata et al., 1985; Koyama et al., 1988; Koyama, 1990). Tandis que les caroténoïdes du complexe du centre réactionnel adopteraient une conformation **cis**, associée aux fonctions de photoprotection (Lutz et al., 1976, 1978; Cogdell et al., 1976; Agalidis et al., 1980).

La forme tridimensionnelle **tout-trans** offre à ce type de pigment plusieurs
 10 fonctions complémentaires: capter, transférer et emmagasiner l'énergie.

Cette configuration est avantagée pour ces fonctions, car elle a un coefficient d'extinction molaire plus élevé. Cet avantage se résume à l'absorption lumineuse et au transfert d'énergie singulet-singulet. De plus, l'état triplet **tout-trans** des caroténoïdes peut emmagasiner de l'énergie triplet, car il ne peut la dissiper
 15 efficacement. Cela pourrait expliquer la grande **versatilité fonctionnelle** de la β -carotène, avec et sans l'antenne collectrice de lumière.

Conclusion

En guise de conclusion partielle, nous pouvons affirmer que **chaque pigment a un rôle spécifique en relation avec son emplacement tridimensionnel.**

20 Suite aux fortes illuminations les pigments se **dégradent à des vitesses variables** (chlorophylles et caroténoïdes). Cette allégation est la pierre angulaire et le point de départ des expériences pour une meilleure compréhension des mécanismes régissant le flux énergétique à travers l'antenne collectrice de lumière et le complexe du centre réactionnel, de la périphérie jusqu'au centre réactionnel.

25 Se basant sur les spectres d'absorption des différents extraits membranaires, face à de fortes illuminations, nous avons constaté la présence d'une **forme de chlorophylle-a** absorbant à des longueurs d'onde élevées (environ 705 nm) et qui serait localisée au sein de l'antenne collectrice de lumière du PSI (LHC-I) et probablement chez le LHC-II mobile. Elle a donc été décelée par le déplacement (vers
 30 le bleu) de la bande d'absorption de la Chl-a (dans le rouge) et caractérisée plus en détail par les spectres de différences. Cette forme de chlorophylle pourrait participer à la **photoprotection** d'autres formes de pigments, sachant qu'elle se photodégrade très rapidement

Sans inventorier chaque pigment de chaque complexe, nous pouvons faire ressortir les caractéristiques originales et les différents points saillants qui nous serviront à mieux comprendre le flux énergétique, et les moyens de photoprotection qu'utilise le PSI. Il est noté que la β -carotène est absente des antennes collectrices de lumière, par contre cette lacune est bien compensée par l'abondance des xanthophylles, notamment la lutéine (63 %) et la néoxanthine (65 %). Ce même pigment (β -carotène) est présent en grande quantité en périphérie du complexe du centre réactionnel (79 %), remédiant ainsi à l'absorption photonique lorsque l'antenne est absente

La distribution précise des différents pigments nous permet d'avoir une approche plus globale du flux énergétique et de la photoprotection que les complexes mettent en branle pour pallier à la surexcitation (**Figure 3**; localisation et proportion relative des pigments au sein des complexes de PSI-200, PSI-100, PSI-30 et de LHC-II. Les rapports en pourcentage de chaque pigment en fonction de son emplacement tridimensionnel sont indiqués entre parenthèses. La localisation des polypeptides est basée sur la littérature. La distinction des deux antennes collectrices de lumière du PSI (LHC-I 680 et 730) est sous forme d'organigramme schématique, sachant que le PSI-200 contient les deux sous-unités et que le PSI-100 en est dénué. Il en va de même pour le LHC-II dont l'emplacement est relative).

Dans ce cadre ci, la dissipation énergétique (triplet-triplet) est assurée principalement par la β -carotène et de façon moins importante, par la violaxanthine. La néoxanthine et principalement la lutéine sont très résistantes aux fortes illuminations: ils ne participent donc que très peu à la dissipation énergétique. Ces deux holochromes pourraient protéger la Chl-a lors de surexcitations (**figure 4**; modèle hypothétique des transferts énergétiques dans le PSI natif (PSI-200). La largeur des flèches est fonction de la quantité de pigments impliqués).

En absence de LHC-I (ou lorsqu'il est sursaturé en photons), le flux énergétique prend une toute autre allure. La principale caractéristique de ce complexe réside dans le fait que la β -carotène, qui est en quantité appréciable, ne participe nullement à la dissipation énergétique. Cette assertion met en doute la fonction de photoprotecteur de la β -carotène véhiculée dans la littérature. Cette dernière figure semble confirmer l'ordre d'efficacité de la transition énergétique chez les caroténoïdes en fonction du nombre de double liaisons conjuguées :

**β -carotène > lutéine > néoxanthine
violaxanthine**

Ces dernières pages ont pour but d'exposer un portrait de la membrane photosynthétique et de mieux comprendre les raisons qui nous ont poussé à adopter les stratégies expérimentales décrites dans les sections suivantes. Le point le plus important, et tout repose sur l'idée de préservation de l'activité photosynthétique. Cette stratégie implique de garder la structure tridimensionnelle de la membrane thylacoïdienne, comprenant les protéines et surtout un bon rapport chlorophylles/caroténoïdes. En raison du fait que la toute première qualité recherchée est la capacité de capturer les radicaux libres, les caroténoïdes doivent être présents et rapprochés des chlorophylles, pour que les transferts et conversions appropriés s'effectuent. C'est dans cette optique que la présente invention a été développée.

L'ART ANTÉRIEUR:

Le brevet américain US 4,698,360 décrit un extrait de plantes comprenant des pro-anthocyanidines utiles comme capteurs de radicaux libres. Le procédé de fabrication de cet extrait comprend les étapes suivantes :

- 1) l'obtention d'une poudre d'écorce de pin,
- 2) l'extraction des principes actifs dans l'eau bouillante,
- 3) la séparation du liquide de la matière solide,
- 4) le refroidissement de la phase liquide à 20°C,
- 5) une étape de filtration,
- 6) la précipitation de protéines indésirables par «salting out»,
- 7) l'extraction des principes actifs en acétate d'éthyle,
- 8) le séchage de la phase organique,
- 9) la resuspension et la précipitation des principes actifs en phase chloroforme,
- et
- 10) une autre étape de resuspension suivie d'une purification plus poussée.

Cette référence s'adresse à l'isolation d'un type spécifique de principe actif de la plante, et non à la préparation de membranes thylacoïdiennes qui comprendraient dans l'ensemble des composantes photosynthétiques, c'est-à-dire dans lesquelles les pigments synthétiques ne seraient pas séparés les uns des autres.

Cette référence est typique des enseignements retrouvés en général dans l'art antérieur. Les références de l'art antérieur s'adressent plutôt systématiquement à l'isolation d'une ou plusieurs composantes de plantes, et jamais à l'isolation de

membranes thylacoïdes dans leur ensemble, qui contiennent une portion majeure de leurs constituantes préservées et activables.

Glick *et al.* (1985) dans *Planta* 164: 487-494 décrivent les variations dans les rapports stoechiométriques des photosystèmes II et I (PSII/PSI) lorsque les plantes (pois) sont soumis à divers types de luminosité. Une lumière verte est utilisée pour évaluer la capacité de transport d'électrons de PSI et PSII en présence d'indicateurs spécifiques comme le 2,5-diméthyl-p-benzoquinone (PSII) et NADP (PSI). La lumière verte n'est cependant pas utilisée pour conditionner les plantes dans un procédé visant l'isolation des membranes thylacoïdiennes intègres et activables. Cette référence vise essentiellement l'étude de la composition des chloroplastes et non la préservation de leur activité en fonction d'une luminosité précise. On conditionne plutôt les plantes dans des luminosités déplétées ou enrichies en longueurs d'onde rouges. Cette référence n'est pas concernée par le fait qu'il faille garder rapprochés les pigments caroténoïdes et chlorophylliens, de façon à favoriser la capture des radicaux libres et le transfert efficace des électrons des chlorophylles aux caroténoïdes. Donc, les conditions visant à garder rapprochés ces pigments et ce, dans un état fondamental, ne sont pas spécifiquement abordées et réunies dans cette référence.

Mason *et al.* (1991) dans *Plant Physiol.* 97: 1576-1580 enseignent une méthode d'isolation des chloroplastes qui fait appel au passage d'une solution de plantes à travers une aiguille numéro 27 à une vitesse de 0.5 ml par seconde, plutôt qu'à un déchiquetage par homogénéisation. La préparation est faite dans un tampon de pH 7.5 comprenant 0.3 M de sorbitol. On installe ensuite cette préparation sur gradient de Percoll où les chloroplastes sont séparés des autres constituantes, y compris des membranes thylacoïdiennes. Ce procédé est donc différent du présent procédé qui vise essentiellement la récupération de ces membranes thylacoïdiennes par des étapes plus simples et plus faciles à conduire à large échelle. Les conditions lumineuses ne sont pas abordées dans cette référence, pas plus que les conditions permettant de garder intègres et rapprochées les constituants de membranes, le but de cette référence étant de garder les chloroplastes et non les membranes thylacoïdiennes intacts.

La demande de brevet canadienne 2,110,038 décrit un procédé de stabilisation d'extraits de plantes. Cependant, ces extraits sont des jus cellulaires et non des membranes thylacoïdiennes. Il n'est pas fait mention d'enlever l'eau comme donneur naturel d'électrons dans les membranes. La solution proposée est donc fort différente

du présent procédé. Un solvant polaire miscible à l'eau (comme un alcool ou un acétone) est ajouté au tissu de plantes qui y est macéré, ou encore ce solvant est ajouté à un extrait aqueux de plantes. Un extrait de substances lipophiles est ainsi obtenu; les protéines précipitent. Les pigments photosynthétiques qui sont liposolubles peuvent être récupérés par cette méthode, mais ils pourraient être dissociés et non
5 demeurer intégrés aux membranes. Il n'est pas certain que des membranes traitées de cette façon garderaient leur intégrité ou encore qu'elles seraient renaturables et fonctionnelles, une fois réhydratées.

En vue de ce qui précède, aucun procédé unitaire et pratique n'est enseigné qui conduise à l'isolation des membranes thylacoïdiennes actives, au moins du point
10 de vue de leur capacité à capturer les radicaux libres et ce, également dans les conditions qui les stabilisent.

Dans un processus d'obtention de membranes thylacoïdiennes actives, le défi est de les recueillir intégrales et activables, de façon à ce qu'elles puissent capter les radicaux libres de façon optimale. Un autre défi est de stabiliser ces membranes de
15 façon à ce qu'elle gardent leur potentiel d'activation pendant plusieurs mois. La durée de vie de tels extraits, qui serait prolongée sur une tablette, ferait en sorte que l'on puisse produire et remiser ces extraits et les écouler sur le marché dans un temps raisonnable sans perte d'activité.

Beaucoup d'information est disponible sur les photosystèmes et leurs
20 composantes. Malgré cette littérature abondante, personne ne semble avoir publié un procédé réunissant des conditions d'isolation et de préservation d'activité de membranes thylacoïdiennes intégrales.

Un tel procédé d'isolation serait donc souhaitable dans le but d'obtenir des membranes thylacoïdiennes à haut niveau d'activité.

25 **LE SOMMAIRE DE L'INVENTION**

La présente invention a pour but de fournir un procédé simple d'exécution visant à obtenir des extraits de membranes thylacoïdiennes dans un état tel qu'elles sont pleinement activables.

Le premier objet de l'invention est donc une méthode de préparation d'un extrait
30 de plante comprenant des membranes thylacoïdiennes à composantes activables, ladite méthode comprenant :

A) un conditionnement de la plante dans un environnement lumineux de longueur d'onde entre 220 nm et 500 nm, qui favorise l'excitation sélective d'un ou plusieurs

pigments photosynthétiques ou dans un environnement lumineux de longueur d'onde entre 500 et 600 nm, qui ne favorise pas d'excitation de pigments, et optionnellement, un conditionnement de la plante dans des conditions sélectionnées parmi la sécheresse, l'hyperosmolarité, un traitement hormonal, la chaleur et le froid, qui permet l'enrichissement sélectif de la plante en constituants induits par lesdites conditions;

5

B) la dispersion mécanique des constituants de la plante ou des tissus de cette plante, dans un milieu liquide permettant de conserver l'intégrité et la fonction des membranes thylacoïdiennes par le contrôle des paramètres suivants dans ledit milieu :

10

- une viscosité correspondant à environ 1 à 1.3,
- une fluidité entre 0.5 et 5 poises,
- un pH de 6 à 8,
- une température comprise entre environ 2 et 20°C, et
- une hypertonicité correspondant à 0.3 à 0.4 M de sucre

15

ladite dispersion mécanique conduisant à l'obtention d'un premier extrait essentiellement constitué de membranes thylacoïdiennes, de débris cellulaires, et d'une phase liquide, lesdites membranes thylacoïdiennes comprenant des pigments photosynthétiques intègres.

20

Cet extrait grossier peut être fractionné, auquel cas la méthode comprend l'étape ultérieure de séparation des membranes thylacoïdiennes des débris cellulaires et de la phase liquide, pour former un deuxième, un troisième et un quatrième extraits constitués essentiellement de membranes thylacoïdiennes, de débris cellulaires et de la phase liquide, respectivement.

25

Le deuxième extrait qui comprend les membranes thylacoïdiennes peut être stabilisé, auquel cas la méthode comprend l'étape ultérieure d'élimination rapide du taux d'humidité dudit deuxième extrait de façon à retirer l'eau comme donneur d'électrons et à stabiliser lesdits pigments photosynthétiques dans l'état où ils sont après l'extraction.

30

L'étape de réduction rapide du taux d'humidité peut être effectuée en congélation et sous vide.

Des extraits résultant de la mise en oeuvre du présent procédé et de ses variantes constituent un deuxième objet de cette invention.

L'utilisation du deuxième extrait résultant de la mise en oeuvre présent procédé et de ses variantes comme capteur de radicaux libres constituent un troisième objet de cette invention.

Les extraits lyophilisés sont activés en les ré-hydratant.

Les extraits utiles comme anti-oxydants comprennent des chlorophylles à l'état singulet et des caroténoïdes à l'état fondamental.

Leur utilisation résulte en le traitement ou la prévention des maladies ou désordres médiés par la formation des radicaux libres, par exemple celles et ceux ayant une étiologie reliée à l'inflammation, le cancer ou le contact avec des irradiations, notamment dans le spectre ultraviolet.

Une composition de matières et un dispositif qui comprennent tout extrait de cette invention sont également sous la portée de cette invention.

DESCRIPTION DE L'INVENTION

Préserver l'activité photosynthétique permet :

1° de maximiser l'effet des différents composés extraits (pigments, protéines, vitamines...),

2° de préserver l'intégrité des différentes molécules actives de la plante,

3° de contrôler l'état des différentes molécules (principalement les pigments).

La production d'extraits comporte plusieurs étapes qui seront optimisées en fonction des caractéristiques de chaque produit fini recherché.

Chacune des étapes sont précédées ou non du terme « optionnelle », ce qui signifie que cette étape n'est pas requise afin d'obtenir l'extrait final mais qu'elle ajoute une particularité qui définit d'avantage une future application.

Le procédé

1. Conditionnement de la matière première

Environnement neutre : lumière verte ou obscurité, ou autre (optionnelle).

Cette étape vise à laisser à l'état fondamental (neutre) ou à modifier la composition des membranes thylacoïdiennes avant leur extraction, afin d'obtenir des extraits enrichis en certaines composantes pour les utilisations particulières.

Conditionnement lumineux : Il est possible de contrôler les états d'excitation en éclairant de façon spécifique un groupe de pigments et non un autre. Par exemple, nous avons trouvé que la violaxanthine serait le protecteur par excellence au niveau de la membrane photosynthétique (Purcell, 1993). Notre méthode d'extraction permet déjà de faire varier le rapport chlorophylles/caroténoïdes; donc deux choix s'offrent à

nous : ajouter artificiellement de la violaxanthine à l'extrait ou mieux encore, contrôler les caroténoïdes comparativement aux chlorophylles, en éclairant à l'aide d'une bande passante très mince (465-475 nm).

Conditionnement thermique : Une brève adaptation à la chaleur provoque la synthèse de protéines du choc thermique. Ces protéines diminuent grandement les problèmes
5 reliés à l'arthrite (Vierling, 1983).

Autres conditionnements : hormonaux, osmotiques, sécheresse, froid, etc...

2. Homogénéisation

La pulvérisation est une technique mécanique permettant d'isoler les différents
tissus foliaires. Elle consiste à couper les organes mésophylliens (feuilles ou aiguilles)
10 à l'aide d'un couteau rotatif (homogénéisateur domestique), par exemple.

Éléments essentiels : - lumière ambiante contrôlée (pour minimiser le flux
d'excitons)

- température du matériel de 2° à 20 C (préférentiellement sous
4 °C) afin d'augmenter la densité cellulaire, principalement
15 chez la vacuole.

- tampon hypertonique (sucre)

Protocole résumé :

2.1. Tampon d'homogénéisation

	Volume, Produit		pH*	Molarité
	poids			finale
20	6 ml	Tampon Tris (1M)	7.0	20 mM
	50 ml	Sorbitol (2 M)		330 mM
	1.5 ml	MgCl ₂ (1 M)		5 mM
25	243.5 ml	H ₂ O		
	300 ml			

le pH peut varier de 6 à 8.

2.2. Faire geler le tampon jusqu'à l'obtention de cristaux

30 **Le rapport plante/tampon est d'environ 1/3 (p/v) (100g/300ml) en prenant**
comme standard l'épinard.

2.3. Homogénéisation au mélangeur, durée : environ 30 secondes

Notes : - les plantes utilisées sont des feuilles d'épinard (d'autres espèces ont aussi
été utilisées)

- le rapport (plante/tampon) peut varier légèrement en fonction de l'espèce végétale (voir la section résultats)
- les tests ont été faits avec le présent tampon, par contre le tampon Tris peut être remplacé, par exemple, par un tampon acétate ou ascorbate, permettant une ingestion sans risque et dans le cas du tampon ascorbate, fournir de la vitamine C.
- le sorbitol est ajouté au tampon pour préserver l'intégrité membranaire (chloroplaste) il pourrait être remplacé par le saccharose commercial, qui est beaucoup moins coûteux. La concentration peut varier entre environ 0.3 à 0.4 M.
- le $MgCl_2$ a été ajouté pour faciliter les mesures biochimiques, mais pourrait ne pas figurer dans le produit final.

2.4. Cette étape est réalisée dans un environnement lumineux contrôlé.

Si la préservation de ces pigments dans leur état fondamental n'est pas une préoccupation première, on peut travailler à des longueurs d'ondes en-dessous de 500 nm ou au-dessus de 600nm.

Cependant, lorsque la préservation des pigments dans leur état fondamental est désirée, il faut travailler dans des conditions particulières

- idéalement à l'obscurité, ou
- à une longueur d'onde d'environ 500-600 nm (lumière verte).

La composition du tampon est choisie du façon à conserver l'intégrité fonctionnelle des membranes. Une viscosité variant entre environ 1 à 1.3 est idéale. Il faut donc ajouter des ingrédients comme des sucres en quantité suffisante. Également, on veut obtenir un milieu d'une fluidité d'environ 0.5 à 5 poises, que se rapproche de la fluidité des membranes photosynthétiques. Un pH neutre (de 6 à 8) a été choisi afin de maintenir une concentration optimale d'ions H^+ à l'aide de tampons. Afin d'éviter que les pigments ne se dissocient, il faut des sucres et un pH acceptables. La densité des fluides cellulaires est maximisée en travaillant au frais et idéalement au froid (0 à 20 °C préférablement en dessous de 4°C).

2.5. L'homogénéisation libère les structures membranaires sans substantiellement modifier les structures moléculaires. On augmente la surface des composantes cellulaires sans protection cellulosique.

À partir d'épinards, le rendement et l'efficacité de récupération de membranes devrait avoisiner une valeur de 10 à 40, normalement environ 25, selon l'équation suivante :

$$\alpha/\beta = 25$$

où α = rapport poids frais/poids sec

5 β = rapport poids frais/volume de milieu hypertonique.

Il est à noter que le rendement peut varier en fonction du volume de tampon choisi. C'est spécialement de cas quand le matériel végétal a un faible pourcentage en eau et/ou une aire de surface cellulosique élevée. En comparaison avec les feuilles d'épinard, des aiguilles de conifères par exemple, requièrent un volume
10 substantiellement plus élevé. Le volume de 300 mL devrait donc être multiplié par un facteur qui s'approche du ratio aire de surface d'un végétal/aire de surface de 100 g d'épinards, afin de s'assurer une bonne extraction.

3. Filtration

Centrifugation : La séparation des thylacoïdiennes (chloroplastes éclatés ou non) des
15 débris cellulaires se fait sur le principe des coefficients de sédimentation. Le coefficient des membranes internes du chloroplaste est supérieur à celui des organites cellulaires. Conditions de centrifugation : 10 minutes à 10,000 x g, dans des godets mobiles. Une force centrifuge moindre mais supérieure à 3000 xg peut être utilisée, en allongeant
20 s'il y a lieu le temps de centrifugation (Figure 6). Durant leur sédimentation, les membranes passent à travers un filtre de 100 à 140 mesh environ (120 mesh
préférentiellement) afin de récupérer un culot de membranes. Les débris cellulaires sont arrêtés par le filtre situé dans une portion supérieure du tube de centrifugation (Figure 5). Le culot peut être utilisé immédiatement tel quel, ou être fractionné ou stabilisé pour
usage futur.

25 Purification (optionnelle) : Les tests que nous présentons ne présentent aucune purification.

Protocole : - resuspendre le culot formé de membranes enrichies en
thylacoïdiennes à l'aide du même tampon que pour
l'homogénéisation mais sans sucre,
30 - centrifuger dans les mêmes conditions (tubes standards).

4. Lyophilisation

Cette technique nous permet de stabiliser les membranes.

- 24 -

Protocole : - recueillir les culots et les déposer dans un vial (les culots obtenus de 100 g de plantes, peuvent être déposés dans le même vial).

- faire le vide dans la chambre et abaisser la température à -50°C

- durée : environ 4 heures.

5 Cette étape permet de retirer rapidement les molécules d'eau liées ou non-liées aux membranes, afin d'éliminer le donneur naturel d'électrons au PSII. Les membranes demeurent stables tant que de l'eau ne leur est pas ajoutée. La procédure de l'extrait que nous prévoyons commercialiser se termine avant ou avec la lyophilisation.

10 5. Fractionnement (optionnelle)

Par ultracentrifugation et séparation chromatographique

Plusieurs complexes spécialisés qui possèdent des propriétés singulières du point de vue fonctionnelle du peuvent être extraits de la membrane thylacoïdienne :

- Centres réactionnels
- 15 ● Complexe de cytochromes
- Enrichie en pigments (chlorophylles, carotènes, xanthophylles)
- Les plastoquinones
- Extraits non photosynthétique (noyaux cellulaires)
- Les mitochondries

20

6. Composition et caractéristiques de l'extrait (partant de l'épinard):

Notre extrait est pur (estimation : $> 90\%$), photosynthétiquement actif, stabilisé et contrôlable.

Contenu :

25

Pigments :	Types	Concentration
Chlorophylles :	chlorophylle-a	50 mg/g de produit
	chlorophylle-b	15 mg/g de produit
Caroténoïdes :		30 mg/g de produit
30 totaux		
Proportions :	chlorophylle-a	55-60 %
	chlorophylle-b	15-20 %
	β -carotène	7-10 %

- 25 -

	lutéine	6-7 %
	néoxanthine	6-7 %
	violaxanthine	4-5 %
	chlorophylline	variable
	zeaxanthine	variable
5	α -carotène	trace
	phéophytine	trace
	phycobilisome	à vérifier
	flavonoïde	à vérifier
	lycopène	à vérifier
10	Autres molécules avec pouvoir anti-oxydatif :	
	Vitamines : (quantité à vérifier)	
	Vitamine A (lié aux caroténoïdes)	
	Vitamines du groupe B (incluant B ₁₂)	
	C (naturelle et ajouté)	
15	K (phylloquinone)	
	F	
	Minéraux : Mg, Fe, I, Zn, Mn, Cl, Cu...	
	Autres : (quantité à vérifier)	
	Thiorédoxine (anti-allergène)	
20	Anthocyanes (stimule la synthèse de collagène et protègent les capillaires)	
	Tanins (anti-oxydant et propriétés cicatrisantes)	
	Cytochromes	
	Plastoquinone	
	Support physiologique aux structures actives :	
25	<ul style="list-style-type: none"> • 60 protéines par centre réactionnel (comparaison - 500 Chl-a/centre réactionnel) 2 fonctions principales : structure et activité photosynthétique; • Lipides (MGDG, DGDG, SQDG et PG). 	
	Dimension des membranes:	
	Environ 70 - 200 Å (7-20 nm)	
30	Activité :	
	Nous comptons utiliser les membranes thylacoidiennes comme "chasseurs" de radicaux libres.	

Afin d'engendrer l'effet désiré (anti-oxydatif), nos extraits présentent une activité photosynthétique similaire à la plante *in situ*. Cette activité permet de bénéficier du plein potentiel des molécules de par le fait qu'elles sont dans leur milieu d'origine. L'organisation moléculaire est telle qu'elle nous permet de contrôler de l'extérieur, l'état des molécules (de transition).

- 5 L'activité a été mesurée par plusieurs techniques : Le dégagement d'oxygène, la photoréduction du DCPIP et la fluorescence. De plus l'intégrité de nos extraits est évaluée par une technique qui consiste à mesurer un courant électrique en continu; une désorganisation (baisse d'efficacité) serait aussitôt détectée.

Stabilité :

- 10 Les pigments sont stabilisés dans leur état fondamental (F_0), ce qui permet d'optimiser et de synchroniser l'effet désiré lorsque les molécules sont excitées dans leur état singulet ou triplet. La stabilité est possible parce que le premier donneur d'électrons de la chaîne (l'eau) a été retiré de l'extrait.
- Cette stabilité (mesurée par l'activité photosynthétique et la concentration des
- 15 chlorophylles et des caroténoïdes totaux) persiste plusieurs mois après l'extraction.

Détection :

Nos extraits sont facilement détectables puisqu'ils fluorescent naturellement; ils peuvent donc être utilisés comme sonde ou être détectés au site d'action.

- 20 **Toxicité :**

Aucun produit toxique, solvant, détergent ou agent de conservation n'a été ajouté, même à faible concentration.

Forme :

- Les extraits se présentent sous la forme solide, sèche ou humide, ou liquide; les
- 25 formes humides et liquides ne sont pas stables longtemps.

Solubilité :

Les extraits sont peu solubles dans l'eau mais se réhydratent facilement, ce qui permet de les réactiver.

Rapidité des réactions :

- 30 L'échange d'information généré dans nos extraits sont de l'ordre de la picoseconde; ce qui en fait les réactions les plus rapides connues jusqu'à maintenant. Ceci permet de réagir efficacement et rapidement au site d'action avant que les

radicaux libres n'affectent les processus cellulaires vitaux (exemple : Caroténoïde _ Chlorophylle environ 3-4ps \pm 1).

7. Application de la technologie

Il nous semble maintenant clair qu'une des voies les plus prometteuses, en vue de commercialiser la technologie, serait dans le domaine des anti-oxydants.

5 Mode d'action, un exemple :

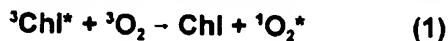
Les molécules les plus largement ciblées sont les radicaux libres oxygénés (\approx OH, \approx O \cdot , O $_2\cdot$, HO $_2\cdot$, \approx O $_3\cdot$, ROO \cdot , RO \cdot , et plus spécifiquement l'oxygène singulet (1 O $_2$). Cette molécule peut se retrouver dans tous les tissus de l'organisme. Elle réagit très facilement avec un grand nombre de molécules qui ont un rôle primordial dans la cellule, en les désorganisant ou en changeant leur conformation. Plus précisément, cette molécule cause des dommages oxydatifs aux liens conjugués (acides gras insaturés, acides aminés aromatiques... Rybek, 1985).

Deux voies sont donc à considérer :
 - La détection des radicaux oxygénés
 - La neutralisation des radicaux oxygénés

Mise en situation : La lumière peut être considérée de nature ondulatoire ou particulaire. La nature particulaire de la lumière est exprimée en quanta ou photons : ce sont des paquets d'énergie dont chacun a une longueur d'onde spécifique. L'énergie de chaque photon est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde. Une molécule (pigment) ne peut absorber qu'un seul photon à la fois, et ce photon ne peut exciter qu'un seul électron.

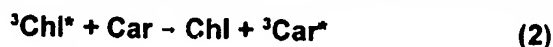
L'électron dans son état fondamental, peut être excité à une distance correspondant à l'énergie exactement égale à l'énergie d'un photon absorbé. Le pigment est maintenant dans un état excité (singulet ou triplet), et l'énergie d'excitation est utilisée lors du processus de la photosynthèse.

Prenons le cas d'une stratégie qui impliquerait le potentiel anti-oxydatif d'un seul composé pour bien illustrer la notion d'anti-oxydant de seconde génération que nous tentons de mettre de l'avant. Ce composé pourrait être la chlorophylle. A titre d'exemple considérons cette molécule excitée dans un état triplet :



La chlorophylle (état triplet: $^3\text{Chl}^*$) qui a absorbé de la lumière en présence d'oxygène, se désactive (état fondamental) en produisant l'oxygène néfaste dans les

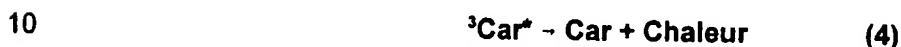
cellules ($^1\text{O}_2^*$). La plante a trouvé un moyen efficace pour palier à ce problème: transférer son énergie non pas à l'oxygène mais à un autre pigment qui a fondamentalement une énergie inférieure. Ces pigments, les caroténoïdes, sont en grand nombre chez les plantes et dans notre extrait; voici donc la réaction:



5 Mais l'inverse est vrai que pour l'état singulet:



Les caroténoïdes dans l'état triplet ($^3\text{Car}^*$), se désactivent sans formation de radicaux oxygénés:



Les anti-oxydants classiques, comme la vitamine C ou E, ne peuvent neutraliser ce type de molécule puisque qu'il leur est impossible d'atteindre l'état d'excitation de l'oxygène singulet par exemple.

15 Donc dans un premier temps il est important de ne pas produire de radicaux oxygénés et donc de se prévaloir des propriétés des différents pigments de nos extraits.

Dans un second temps, il est nécessaire de se débarrasser des radicaux oxygénés. Nous proposons de le faire en utilisant les chlorophylles dans leur état fondamental:



À la lumière de ces réactions, nous voyons que la réaction 5 est réversible (voir réaction 1) et que c'est justement cette réversibilité qu'il faut restreindre. Les pigments dans leur état fondamental (Chl de la réaction 5 par exemple, comparativement à $^3\text{Chl}^*$ de la réaction 1) sont largement favorisés. De la réaction 5, il nous faut donc 25 désactiver la $^3\text{Chl}^*$ pour ne pas provoquer sa réversibilité. Cette désactivation se fait spontanément en présence d'un caroténoïde dans son état fondamental (voir réaction 2 suivie de la réaction 4).

Il est important de mentionner que ces réactions se produisent de façon spontanée et en absence de lumière.

30 Il y a donc trois voies pour générer la $^3\text{Car}^*$:

1° La recombinaison de charges dans le centre réactionnel (d'où l'importance de l'activité photostynthétique)

2° L'homofission (singulet) entre les caroténoïdes

3° Le transfert énergétique (triplet) d'une chlorophylle vers une caroténoïde chez les antennes collectrices de lumière.

Les voies 2° et 3° indiquent un rapport étroit (proximité) entre les caroténoïdes (Car-Car) et les chlorophylles (Chl-Chl) dans les antennes. Le transfert énergétique
5 entre caroténoïdes s'effectue dans l'ordre de la femtoseconde (Owens et al. 1992, Research in photosynthesis Vol. I, p. 179-186), ce qui pourrait expliquer la versatilité de ce type de pigment.

Donc si on résume brièvement la dernière section on peut affirmer:

1° Les chlorophylles et les caroténoïdes doivent avoir une organisation structurale
10 permettant ces transferts énergétiques. Cette condition est respecté seulement si la structure tridimensionnelle est préservée. Ce qui implique d'avoir non pas des pigments mais une structure membranaire comme elle existe dans la plante. Cette membrane est donc inévitablement constitué d'un ensemble de lipides, protéines et de pigments bien organisés.

15 2° Les transferts énergétiques sont possibles que si la membrane est biologiquement active. Se qui veut dire que la distance entre les différents complexes pigmentaires et protéiques est respectée.

Il est a noter que l'utilisation de la lumière (faible ou forte énergie) nous permettra de contrôler l'extrait dans le cas d'utilisations spécifiques.

20 8. Secteurs d'application envisagés

Les produits/applications

À la fin du processus, la plante aura ainsi produit toute une gamme de composés plus ou moins complexes et spécifiques tels que sucres, protéines, lipides, vitamines et minéraux qui se présentent sous formes variées et en quantité variable
25 dans les différentes espèces végétales.

Parmi les composés présents dans les différentes espèces végétales, certains présentent des intérêts industriels particuliers. A cet égard de nombreuses études ont mis en évidence certaines propriétés de plusieurs composantes des plantes supérieures à des fins de santé ou de soins corporels et à d'autres usages industriels.
30 Notre (nos) extrait a des caractéristiques singulières que nous pouvons utilisées dans différentes secteurs. Ils se distinguent particulièrement par le fait qu'ils sont actifs. Ce terme est ici utilisé pour exprimer l'état natif des différentes molécules et complexes moléculaires. La littérature regorge de bienfaits associés à ces molécules. Par contre

ces molécules sont étudiées dans l'environnement propre aux plantes; une fois retirées de leur environnement moléculaire, leur interaction, structure et fonctionnement, sont dans la plupart des cas, très différents et donc ne présente plus les promesses de départ. Le procédé mis au point permet de garder l'intégrité *in vivo*.

Les sous-sections qui suivent ont pour but de dresser de façon non-exhaustive les différentes avenues qu'offre l'extrait ou les extraits produit par l'entreprise.

Les nutraceutiques (aussi applications pharmaceutiques)

La meilleure source pour de tels produits se retrouve dans la biomasse végétale. Beaucoup de produits commercialisés sous forme de suppléments nutritifs avec effets bénéfiques sur la santé sont disponibles sur le marché. Pour la plupart ce sont souvent des plantes ou parties de plantes déshydratées et moulues ou des extraits sous forme d'extraits liquides et d'huiles essentielles. Dans bien des cas, les différents traitements et manipulations en cours de fabrication ont profondément altéré les structures moléculaires et ainsi diminué considérablement les propriétés originales recherchées.

Des produits nutraceutiques de grande qualité seront dorénavant produits, qui se démarqueront de la compétition par le fait que les structures moléculaires fonctionnelles seront conservées intégralement et les structures inutiles seront éliminés. Les produits seront purs avec activités biologiques scientifiquement démontrables.

Dans cette section, nous avons donc répertorié les différents éléments actifs et subdivisés en larges fonctions :

Antioxydants

Ce sont des composés qui interagissent avec les formes active de l'oxygène (oxygène singulet, peroxyde d'hydrogène, anions super-oxydes et quelques radicaux hydroxyl) pour former des produits de dégradation inoffensifs. Ces formes d'oxygène actives dégradent ou inactivent d'autres molécules et causeraient potentiellement des mutations, des cancers et participeraient au vieillissement.

Dressons une liste non-exhaustive des différents antioxydants présent dans nos extraits :

Les **chlorophylles** (a aussi des propriétés antianémiques), les **caroténoïdes**, ainsi que plusieurs **vitamines** (B : épiderme, métabolisme cellulaire, système immunitaire... C : dégradation des radicaux libres oxygénés, stimule les réactions immunitaires, assimilation du fer..., E, K...), **cytochromes** et **anthocyanines**.

Anticarcinogènes

Cette activité résulte directement ou indirectement de l'activité antioxydative.

Exemples :

- 5 **Chlorophylle et la chlorophylline** (produit de dégradation de la chlorophylle), cette dernière molécule est très soluble dans les fluides corporels comme le sang et dans les cellules. Il existe des évidences scientifiques que la chlorophylle offre une protection contre des toxines chimiques et la radiation. Des travaux à l'Université du Centre Médical du Texas ont démontré que des plantes et légumes verts inhibaient les effets cancérigènes de certains produits chimiques, et que plus il y avait de chlorophylle dans ces plantes ou légumes, plus l'effet protecteur était grand. La
- 10 capacité de la chlorophylle à réduire la mutation des gènes causée par les carcinogènes a été démontré par plusieurs laboratoires dans la dernière décennie, cette capacité étant meilleure que celle de la vitamine A, C ou E.

Plusieurs **caroténoïdes** font et ont fait l'objet de recherches intensives sur le sujet, mentionnons seulement la β -carotène, la lutéine et la zeaxanthine.

15 **Régénérescence des tissus**

Nos extraits contiennent une quantité importante de **protéines**, d'acides aminés et **complexes minéraux** (fer, iode, silicium, zinc, magnésium, cuivre...) pour leur fonctions essentielles dans les nombreuses activités métaboliques.

Agent bactéricide

- 20 De nombreux tests en laboratoires ont démontré la capacité de la **chlorophylle** à contrôler les germes. Elle est principalement bactériostatique, mais aussi bactéricide. Ceci implique que la chlorophylle contrôle les germes principalement en créant un environnement où ils ne peuvent plus se multiplier.

Agent cicatrisant.

- 25 Plusieurs thérapies topiques font usage d'agents cicatrisants sur la peau. Le nombre de conditions de surface où la **chlorophylle** a été utilisée avec succès en est presque incroyable. De plus, qu'elle soit ingérée, injectée ou appliquée en surface, tous les tests sur les animaux et humains ont toujours démontré que la chlorophylle n'avait absolument aucun effet secondaire, ni aucun effet toxique. Cette capacité de
- 30 cicatrisation est extrêmement importante quand on sait qu'une blessure peut souvent être infectée et que la chlorophylle contrôle également les bactéries. Elle devient le traitement idéal, car en plus elle contrôle les odeurs, les démangeaisons, la douleur et les irritations.

Suppléments énergétiques

Un supplément alimentaire sous forme d'énergie libre (Adénosine TriPhosphate=ATP). L'ATP produit à l'intérieur du chloroplaste ne sert pas seulement d'élément de construction pour les acides nucléiques, c'est aussi le fournisseur central d'énergie pour toutes les cellules.

- 5 Actuellement, de nombreuses substances sont exploitées sur une base industrielle à travers des produits commerciaux dont la valeur nutritive ou fonctionnelle est considérablement diminuée par les différents traitements que la matière première a subie. En effet, la plupart des complexes moléculaires fonctionnels sont très sensibles et doivent demeurer intacts pour conserver leurs propriétés biologiques. La
- 10 chlorophylle par exemple se dénature aussitôt extraite de la feuille, se transformant en produits secondaires dont les propriétés pourront être fort différentes.
- Les extraits spécifiques visés par présent procédé sont, à toutes fins pratiques, aussi variés que le nombre de molécules présentes dans la biomasse végétale utilisée. La production d'extraits sera ajustée en fonction de la demande industrielle. Que ce soit
- 15 à partir de la membrane thylacoïdienne ou du chloroplaste ou d'autres fractions, les produits sont en fait des complexes moléculaires spécialisés, caractérisés par des propriétés fonctionnelles d'intérêt industriel.

- Toujours d'après une étude de *TC Associates Inc.*, un des facteurs expliquant le succès des produits nutraceutiques/nourritures fonctionnelles est entre autres la
- 20 demande croissante de produit de consommation usuel dont un nutraceutique a été ajouté (ex : margarine vitaminée).

Plusieurs bases scientifiques sur les nutraceutiques ont été tiré des travaux récapitulatifs de G. Dutton (Dutton, 1996).

Les cosméceutiques

- 25 Le marché des cosméceutiques est également un marché extrêmement important. Une grande proportion des ingrédients utilisés par l'industrie cosmétique provient des plantes supérieures. L'industrie cherche activement à mettre en marché une nouvelle génération de produits pour soins corporels efficaces, tels que des produits qui favorisent l'hydratation et l'élasticité de la peau, qui facilitent la
- 30 cicatrisation ou qui réduisent les effets du vieillissement. Ces produits sont basés sur l'intégration d'ingrédients actifs éprouvés.

Encore une fois ici, les propriétés des plantes utilisées sont souvent très altérées par les procédés de fabrication, et ce fait constitue l'intérêt même de

l'intervention de la présente technologie dans ce marché, en étant en position de fournir, aux grandes entreprises industrielles de ce secteur, des extraits spécifiques de qualités exceptionnelles et exclusives.

Nos extraits deviennent de bon protecteur de la peau puisqu'ils peuvent absorber la lumière et les U.V. sans produire d'oxygène singulet.

5 Leur utilisation réduit les risques associés à la formation de radicaux libres.

Le domaine environnemental/agro-alimentaire

10 L'utilisation de molécules et complexes moléculaires à activités biologiques est de plus en plus fréquente dans tous les secteurs industriels pour la fabrication d'instruments de mesure de type bio-senseurs, notamment comme outil diagnostique en santé, pour la détection de contaminants en environnement ou comme outil de contrôle de production dans l'industriel bio-alimentaire.

15 Dans ce secteur d'activités, l'industrie est à la recherche de bases technologiques qui permettraient d'améliorer la sensibilité de leurs équipements. La présente technologie offre de nombreux avantages distinctifs et exclusifs, basés sur la très grande sensibilité du phénomène de transport d'électrons ayant lieu dans certaines parties spécifiques de la plantes lors de la photosynthèse.

9. Aucune restriction d'espèces végétales

20 Le concept de fractionnement et extraction développée ici peut être exploitée avec n'importe quelle espèce de plante verte. L'espèce végétale qui servira comme matière première sera déterminée en fonction des besoins de production d'extraits (éléments spécifiques recherchés) et de ses caractéristiques particulières pour optimiser l'exploitation industrielle (voir la section résultats).

La matière première

25 La technologie de est très flexible et offre la possibilité de sélectionner la biomasse végétale qui présente les caractéristiques recherchées en fonction des besoins spécifiques. Donc, l'espèce végétale qui sera éventuellement utilisée comme matière première, sera sélectionnée selon ses propriétés particulières et sa disponibilité, en fonction de l'extrait spécifique à produire. Il est à noter que les organismes photosynthétiques (cyanobactéries, algues ou plantes supérieures) se ressemblent beaucoup au niveau organisationnel, mais chacune possède de subtiles particularités qui les distinguent.

30

Extraits actifs sous leur forme originale

Les extraits se présentent sous leur forme originale et conservent leurs fonctions métaboliques. Cette particularité exclusive favorise la bio-disponibilité des protéines, vitamines et minéraux, l'efficacité des éléments antioxydants et améliore l'absorption (pré-digestion). Cela permet le contrôle de la synthèse et du maintien de macro-molécules ou complexes protéiques comme l'ATP, par l'utilisation de la lumière, mais aussi de conserver l'intégrité comme dans le cas de la chlorophylle. La chlorophylle-a se présente comme étant le pigment essentiel de la photosynthèse. Les pigments caroténoïdes, outre leur participation à la photosynthèse, exercent aussi une fonction de protection (Purcell, M. et Coll. (1994) "*Homogeneous photobleaching of chlorophyll holochromes in a photosystem I reaction center complex*". Photochem. Photobiol. 59, 215-218), par le fait qu'ils bloquent des formes d'oxygènes hautement réactives tel l'oxygène monovalent, empêchant ainsi la photo-oxydation de la chlorophylle, tout en préservant ainsi d'autres molécules et d'autres processus d'un éventuel endommagement. Seules quelques molécules de chlorophylle-a sont photochimiquement actives, c'est le cas notamment de celles des " *centres réactionnels* ". Les autres molécules de chlorophylle-a (quoique identiques chimiquement) forment avec la chlorophylle-b et les carotènes photosynthétiquement actifs, des complexes de protéines et de pigments collecteurs de lumière. C'est pourquoi il est primordial de préserver l'environnement moléculaire des chlorophylles et de s'assurer que les chlorophylles du centre réactionnel sont présentes.

• Stabilité du matériel

De par l'absence d'eau dans les extraits, ils sont stables dans le temps (activité photosynthétique; absence de bactérie, moisissure, levure...) et l'aspect physique favorisant entre autres un accroissement de la maniabilité.

• Valorisation optimale de la biomasse

Très peu de perte de la biomasse végétale grâce à un procédé à fractionnement évolutif. Les résidus qui constitue une fraction importante de la biomasse initiale, sont valorisés pour une autre application (voir la section résultats).

• Exploitable à l'échelle Industrielle

Chaque élément du concept peut être converti pour une transformation industrielle de la biomasse et éventuellement être intégré à un procédé de fabrication en continu.

• **Contrôle de qualité**

Le procédé de production comporte plusieurs étapes. À la fin de chaque étape, un dosage et des mesures d'activité biologique seront réalisés pour constamment assurer la qualité du produit en cours de production.

• **Reproductibilité**

- 5 Chaque résultats est le fruit de trois expériences et présente une erreur inférieure à 5%.

10. Modes d'action des extraits

La présente technologie se distingue par le fait que les extraits sont actifs au niveau photosynthétique : qu'est-ce que ça signifie et quels sont les avantages?

- 10 Les experts s'entendent sur le fait que plusieurs désordres cellulaires ou tissulaires prennent leurs sources par l'inhibition de molécules vitales à l'organisme (protéines de structure, hormones, enzymes...). Les fruits, légumes et graines contiennent une grande variété de molécules et complexes phytochimique pouvant moduler le maintient et l'amélioration de la santé (Waladkhani, 1998; Wattenberg, 15 1992; Stravric, 1994). Avant de cibler et d'énumérer les diverses molécules pouvant jouer ce rôle, nous allons résumé les divers modes d'actions impliqués.

De façon générale, nous pouvons regrouper les différents modes d'actions des substances chémopréventives en sept groupes :

- 1° Prévention de la formation ou de l'absorption de carcinogènes
- 20 2° Élimination des carcinogènes
- 3° Protection des sites nucléophiliques de l'ADN
- 4° Inhibition des complexes carcinogènes/ADN
- 5° Modification de l'activité des enzymes métaboliques
- 6° Modification de l'activité des autres types d'enzymes (voir 5°)
- 25 7° Antioxydant

- Pour bien comprendre les modes d'action de nos extraits, prenons le cancer comme exemple. Les phytomolécules peuvent inhiber les carcinogènes par l'induction de certaines enzymes (phase I et II), par l'élimination d'agents réagissant avec l'ADN, par la suppression de la prolifération anormale de lésions prénéoplastiques et aussi 30 par l'inhibition de certaines propriétés des cellules cancéreuses (Wattenberg, 1992).

Je propose donc une brève énumération des composés agissant sur l'une ou l'autre des réactions pré-citées :

- 1° La chlorophylle/chlorophylline (modes d'action possibles : 4, 5 et 7)

La chlorophylle a un potentiel anticarcinogénique élevé; ce pigment est très abondant dans nos extraits. La chlorophylle ainsi que son dérivé, la chlorophylline, ont démontré un comportement antimutagénique contre une grande variété de carcinogènes humains (Vibeke, 1995; Dashwood, 1992; Negishi, 1989; Lai, 1980). Par exemple il suffit de 1,500 ppm de chlorophylline pour se protéger contre l'aflatoxine B1 (inducteur d'hépatocarcinogénèse). Pour un même effet, la concentration de chlorophylle doit être plus élevée (Khalyfa, 1992).

2° Les caroténoïdes (modes d'action possibles : 5 et 7)

Les caroténoïdes sont un groupes de composés regroupant plus de 600 molécules synthétisées par les bactéries ou les plantes. Leur habileté à réprimer (quench) l'oxygène singulet et leur fonction comme antioxydant a généré plusieurs hypothèses concernant leur rôle de protecteur envers les dommages oxydatifs comme le cancer et les maladies cardiovasculaires. D'autre part, plusieurs évidences suggèrent que les caroténoïdes pourraient moduler les processus reliés à la mutagenèse et à la différenciation cellulaire aussi bien que leur rôle d'antioxydant et de précurseur de vitamine A (Levy, 1995; Matsushima-Nishiwaki, 1995). Par exemple, la consommation d'aliments riches en β -carotène et un taux sanguin élevé de ce pigment, seraient associés à une réduction du risque du cancer du poumon. De plus, la lutéine et les lycopènes, très abondants caroténoïdes, offrent un potentiel antioxydant exceptionnel (Khachik, 1995).

Les chlorophylles et les caroténoïdes sont en grande quantité dans nos extraits et sont le fer de lance de notre procédé. Plusieurs autres phytoconstitués sont reconnus pour avoir des propriétés aussi importantes que ces deux pigments. L'étude que nous avons menée à ce jour comporte aucune analyse sur les autres constitués, nous ferons donc que les énoncer en mentionnant leur mode d'action.

3° Les flavonoïdes (modes d'action possibles : 2, 4, 5, 6 et 7)

(références : Kandaswami, 1994; Marshall, 1993)

4° Les glucosinolates et les indoles (modes d'action possibles : 4, 5 et 7)

(référence : McDanell, 1986)

5° Les isothiocyanates

(référence : Hecht, 1995)

6° Composés phénoliques (modes d'action possibles : 1 à 7)

(référence : Rice-Evans, 1996)

7° Inhibiteurs de protéase (modes d'action possibles : 6 et 7)

(référence : Kennedy, 1994).

11. Mesures de l'activité photosynthétique et dosage préliminaire des pigments

Mesure de l'activité photosynthétique

Sans entrer dans les détails, deux techniques d'évaluation de l'activité photosynthétique ont été mises de l'avant : le dégagement d'oxygène et la photoréduction du DCIP (2,6 dichlorophénol indophénol), tous deux largement acceptées dans la communauté scientifique. Nous présenterons que les mesure de photoréduction pour alléger le texte, considérant la linéarité des équivalences.

Pour toute les expériences d'activité, nous avons utilisé le PSII comme contrôle, car cet extrait est bien connu de notre laboratoire et largement documenté dans la littérature. La technique a donc été ajusté avec cette particule, autant au niveau de la concentration de DCIP, de chlorophylle et d'illumination.

Plus la concentration en chlorophylle dans l'extrait est élevée plus l'activité est grande. Ce qui est démontré par la pente des différentes courbes, exprimée par la diminution de l'absorbance relative en fonction du temps d'illumination (figure 7).

Nous avons résumé deux conclusions importantes dans la figure suivante (figure 8). Premièrement, l'étape de lyophilisation (en présence de tampon) garde l'intégrité des membranes photosynthétiques comparativement au culot humide. Deuxièmement, les grandes vedettes de l'activité sont les conifères, comme le pin (l'épinette noire a aussi été étudié avec des résultats similaires).

Longévité de l'activité photosynthétique

Il est primordial de vérifier l'activité de nos extraits résistent à travers le temps. Le lyophilisat est gardé à la température de la pièce et analysé ultérieurement à fréquence régulière.

La figure 9 nous montre les variations de l'activité (relative de 1 à 10; axe des y) en fonction du temps. Les deux conifères étudiés préservent leur activité (plus de 75%) même après 1 mois. Une trop faible activité ayant été observée pour le gazon, la procédure a été reprise avec des ajustements quant au volume de tampon et le temps d'homogénéisation. Les résultats sont montrés à la figure 10.

30 Dosage des pigments

La figure 11 (tableau) montre dans un premier temps l'indice d'activité des extraits obtenus de notre procédé standard (sans ajustement), avec plusieurs espèces, soit le pin, l'épinette, l'épinard, et la fougère. A noter que nous avons aussi extrait les

aiguilles d'épinette en présence des branches (ce qui faciliterait grandement la récolte). A l'exception du gazon qui est après l'étape de lyophilisation, inactif, tous les extraits présentent une activité de moyenne à excellente. Il faut bien comprendre que l'importance de la technique est d'obtenir de l'activité avec l'extrait sec, et que les valeurs ne sont qu'accessoires et relatives. Nous avons étudié quatre produits
 5 compétiteurs, reconnus sur le marché comme étant de la chlorophylle ou en ayant en grande quantité. Aucun de ces produits s'est avérés actifs.

Dans le cas des pigments (chlorophylles totales et caroténoïdes totaux), chacun des produits affichent de très grandes concentrations. Par contre, les produits compétiteurs en ont de très faibles concentrations. Seul le produit des *laboratoires*
 10 *Swiss* affiche une concentration en chlorophylles assez élevée. Il est à noter que lors des ces dosages préliminaires, la distinction entre chlorophylle-a et -b et phéophytine-a et -b n'a pas été faite. Une étude plus approfondie (spectre d'absorption par balayage de longueur d'ondes) déterminera si il s'agit bien de chlorophylle en grande concentration ou un produit de dégradation. Nous croyons que c'est un produit de
 15 dégradation pour deux raisons : premièrement parce que ces produits affichent aucune activité et deuxièmement la concentration affichée (sur l'étiquette) est au moins sept fois inférieure à celle dosée en laboratoire; donc il y a eu dans le meilleur des cas, dégradation des pigments principalement parce qu'ils ne sont pas adéquatement protégés.

20 **Valorisation de la biomasse**

Cette section ne fait pas partie intégrante du présent projet.

Le procédé implique une centrifugation dans le but d'obtenir un culot qui est par la suite lyophilisé. Le filtre ne laissant passer que les membranes chloroplastiques (surtout internes), laisse un **gâteau résiduel** qui présente des propriétés fort
 25 intéressantes :

- 1° Même s'il est gorgé de sucre (du tampon d'extraction), après quelques semaines, aucune trace de détérioration ou putréfaction n'est détectable, ce qui est très visible après quelques jours pour n'importe quel extrait classique. La cause : la chlorophylle résiduel...
- 30 2° À cause de 1°, ce gâteau résiduel pourrait servir de filtre à air dans des tours à bureaux

3° Ce gâteau résiduel n'a pas encore été analysé, mais il est évident qu'il contient une forte concentration de fibres et sucres complexes, donc excellent pour l'alimentation (anti-cancer!!!) des animaux.

À titre de supplément alimentaire les membranes peuvent produire de l'énergie libre (Adénosine TriPhosphate=ATP). Les applications sont multiples: amélioration de la performance des athlètes, supplément énergétique aux personnes âgées et s'incorpore dans l'adoption d'un régime alimentaire sain et équilibré de toute personne désirant sa vitalité.

Le corps humain contient environ 50 g d'ATP seulement, par contre cette quantité est réutilisée environ 4000 fois par jour (turnover de l'ATP); donc utilise près de 200 kg d'ATP quotidiennement. Je crois que la quantité endogène d'ATP est limitante. En d'autres termes, augmenter la quantité totale d'ATP dans le corps pourrait favoriser de façon significative son utilisation lors des processus biochimiques ou mécaniques.

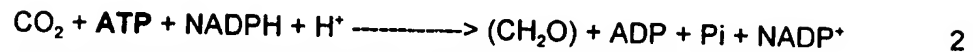
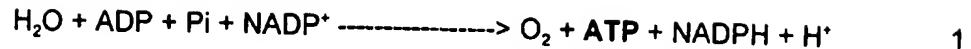
Le but du projet est de préparer un extrait membranaire non seulement riche en ATP, mais contrôlé et assimilable par l'organisme, sans oublier que cet extrait est actif donc vivant.

L'ATP ne sert pas seulement d'élément de construction pour les acides nucléiques, c'est aussi le fournisseur central d'énergie pour toutes les cellules. La rupture des liaisons entre les groupes phosphoryle de l'ATP peut se coupler à d'autres réactions de façon à ce que l'énergie libérée puisse être utile à d'autres processus cellulaires. Les réactions biochimiques mettant en jeu l'utilisation d'ATP sont multiples et vitales pour l'organisme (biosynthèses, transport actif de certaines molécules et ions, contraction musculaire...). Le grand fabricant d'ATP chez l'humain reste incontestablement la mitochondrie: organite présent dans toutes cellules d'organismes, l'humain compris. Ce processus est appelé phosphorylation oxydative (ou respiration cellulaire). Par contre chez les végétaux un deuxième organite utilise un mécanisme similaire pour produire de l'ATP, il s'agit du chloroplaste. La photophosphorylation (production d'ATP) chez les plantes produit plus d'ATP, et cela de façon significative, que dans la mitochondrie (Salisbury, 1992). C'est en utilisant la photosynthèse (modification du processus) que je compte produire, véhiculer et protéger l'ATP contre l'hydrolyse et ainsi pouvoir l'utiliser de façon ciblée.

La photosynthèse comprend deux processus fondamentaux que l'on peut résumer par deux réactions partielles:

- 40 -

LUMIÈRE



5 Dans le premier processus (phase en présence de lumière), des protons puisés dans l'eau (du chloroplaste) pour produire de l'ATP. Le deuxième processus photosynthétique consiste en l'utilisation du NADPH et de l'ATP dans une série de réactions qui mènent à la réduction de l'anhydride carbonique gazeux en glucides, principalement de l'amidon. Ces deux réactions se produisent simultanément; à mesure que les produits formés par le processus 1 sont investis dans la mise en

10 marche des réactions du processus 2.

La première réaction est celle qui nous intéresse, par contre nous devons inhiber la deuxième, afin de garder l'ATP sous une forme utilisable. L'intégration du CO_2 gazeux à un composé organique a lieu au cours de la première étape d'une cascade de réactions appelée cycle de Calvin. Celle-ci est catalysée par la ribulose

15 1,5-biphosphate carboxylase-oxygénase, abrégée en RuBisCO. La protéine RuBisCO compte pour environ 50% du contenu en protéines solubles des feuilles; c'est donc l'enzyme le plus abondant de la biosphère. Bien que la concentration des sites actifs de RuBisCO dans le stroma (intérieur du chloroplaste) puisse atteindre 4 mM, cette enzyme est si étroitement contrôlée, que son activité peut limiter la vitesse

20 d'assimilation du carbone de façon drastique. C'est au niveau de la distribution et de l'efficacité de cette enzyme qu'il faut intervenir afin d'accumuler l'ATP et d'empêcher son utilisation au niveau du chloroplaste.

Problématiques:

A- Contrôler les réactions de fabrication et maintenir les concentrations d'ATP élevées

- 25 Propositions: 1° Ces processus sont contrôlés par la lumière; donc nous pouvons intervenir pour régulariser les concentrations et l'efficacité de formation.
- 2° Les concentrations d'ATP formées sont de beaucoup supérieures à ceux de la mitochondrie.
- 30 3° Possibilité de modifier le pH interne du chloroplaste et la concentration en Mg^{++} (afin de protéger l'ATP de l'hydrolyse).

4° Possibilité de régulariser les concentration de CO_2 et d' O_2 dans le milieu pour ainsi contrôler chacune des deux réactions ci-haut mentionnées.

5° Utiliser des cellules en croissance au lieu de cellules matures car il contiennent d'avantage d'ATP et moins de glucides de réserve.

5

B- S'assurer que l'ATP produit, ne soit pas hydrolysé ou utilisé pour fabriquer des sucres.

Propositions: 1° Un inhibiteur naturel de la RuBisCO est connu.

10

2° J'ai par le passé muté et cloné une forme désactivée de la RuBisCO.

3° Purification de chloroplastes dans un tissu pauvre en RuBisCO.

15

4° Utilisation de plantes dont leur activité enzymatique (RuBisCO) optimal est autour de 25°C (donc ouvre la voie au produit stable à la température de la pièce). De plus certaines de ces plantes (disponible au Québec) ont un taux de photosynthèse, donc d'ATP, de 2 à 40 fois supérieur que la très grande majorité des plantes.

20

5° Augmenter la concentration d'un intermédiaire comme le malate afin de court-circuiter l'utilisation d'ATP.

C- Les cellules humaines reconnaîtraient-elles et pourraient-elles utiliser l'ATP d'origine végétale?

25

- Le fait que l'ATP provienne d'un végétal, n'influence en rien la reconnaissance ni l'assimilation de l'ATP.

30

- Les experts consultés (biophysicien des transferts énergétiques, hématologue—>dopage énergétique par des produits sanguins...) affirment qu'il n'y a aucune barrière à la reconnaissance et à l'assimilation de l'ATP, même s'il n'y a aucune documentation sur le sujet; donc personne travail sur un modèle comme celui présenté ici (probablement que les difficultés rencontrer chez la mitochondrie, principalement sur le contrôle de l'ATP en ont rebuté plusieurs).

Il n'existe rien de tel sur le marché. Par contre il existe depuis un certains nombres d'années, des produits en vente libre favorisant le développement musculaire, sans

pour autant libérer de l'énergie utilisable. Le plus sérieux produit est la créatine. C'est un composé azoté présent dans le muscle sous forme de créatine-phosphate. L'énergie contenue peut être transférée à l'ATP pour être utilisée dans la contraction musculaire. Donc son efficacité dépend de la disponibilité de l'ATP. La créatine pourrait être utilisée pour favoriser l'absorption de l'ATP (du chloroplaste), donc de façon conjointe à l'extrait.

La détection de la toxicité

Le déversement de produits chimiques dans les écosystèmes aquatiques ou terrestres provoque une variété de réponses complexes. La composition chimique de l'eau contaminée (effluent ou lixiviat) fournit des données utiles, certes, mais n'informe pas sur la toxicité de ces contaminants sur les organismes vivants, ni sur leurs effets sur la chaîne alimentaire. Pourtant, de telles données toxicologiques sont essentielles pour évaluer les risques environnementaux associés à la présence de ces contaminants. Aussi le développement de nouveaux tests de toxicité simples, sensibles, rapides et peu coûteux, est-il devenu un enjeu important. Des organismes vivants étant généralement utilisés, ces tests sont appelés bioessais ou phytoessais (voir glossaire). Pour être validés, les bioessais doivent remplir quelques conditions minimales: i) ils doivent être représentatifs du milieu à l'étude; ii) être représentatifs des espèces des autres niveaux trophiques; iii) générer des résultats reproductibles et iv) fournir un minimum de faux diagnostics. En regard de ces contraintes, les partenaires environnementaux s'entendent pour cibler certains milieux plus "sensibles". Les effluents industriels et agricoles, les sols contaminés, les systèmes d'assainissement des eaux usées municipales en sont quelques exemples.

Le détecteur de toxicité à l'étude possédera la flexibilité voulue pour analyser plusieurs types de matrices (effluents, lixiviats, éluviats, etc.) et se montrer également sensible aux polluants spécifiques provenant des secteurs susmentionnés. En fait, l'appareil projeté tient à la fois du bioessai lorsque utilisé avec un organisme entier (à l'exemple des biotests Microtox^{MD}, truite, daphnie) et du biosenseur (répondant spécifiquement à certains contaminants ou groupe de contaminants) lorsque utilisé avec des extraits d'organismes végétaux.

Le détecteur de toxicité pourrait être utilisé pour suivre la toxicité en temps réel dans de nombreuses entreprises. Nous pouvons déjà cerner trois grands secteurs d'application: l'industrie des pâtes et papiers (apport rapide de correctifs sur les procédés); le secteur de l'analyse des sols contaminés (information sur la

biodisponibilité et l'efficacité des procédés de restauration ou de traitement des eaux de lixiviation); et le milieu agricole (détection fine de pesticides).

La pertinence de nouveaux biotests mieux adaptés ne peut être mise en doute dans un esprit de développement durable. D'ailleurs les différentes instances gouvernementales (les ministères de l'Environnement au premier chef) appuient
5 fortement la recherche dans ce secteur. Tel que dit précédemment, notre futur produit pourrait trouver une niche commerciale dans le secteur des industries polluantes, réglementées ou en voie de l'être.

Prenons le seul exemple des papetières. Déjà, de nombreux contacts ont été pris avec des compagnies papetières et il en ressort qu'un nouvel outil de détection
10 de toxicité serait très profitable. La tendance est aux réglementations qui exigent des papetières que les effluents rejetés dans le milieu récepteur ne causent aucune toxicité létale aiguë. Le protocole impose des essais biologiques sur les poissons ou sur le cladocère *Daphnia magna* périodiquement pour chaque effluent. Celui-ci est considéré toxique si, dans l'échantillon non dilué, on observe plus de 50% de mortalité des
15 organismes testés.

Une étude récente a démontré que malgré la mise en place de systèmes de traitements secondaires efficaces, des problèmes de toxicité se sont produits dans plusieurs usines de pâtes et papiers canadiennes en 1996 (Kovacs & O'Connor, 1996). Diverses substances ont été pressenties comme étant en cause: ammoniacque,
20 acides gras et résiniques, chlorophénols, etc. Mais le véritable problème réside dans le long délai d'obtention des résultats des biotests (48 h pour daphnie et 96 h pour la truite). Cette situation, ajoutée aux contraintes de la réglementation, complique grandement l'établissement d'un plan correctif et représente donc un irritant pour les coordonnateurs environnementaux des usines concernées. Dans la situation actuelle,
25 une période de trois à six semaines est généralement requise pour identifier le problème en cause, trouver les correctifs nécessaires et s'assurer de la stabilité des correctifs mis en place. Cette période s'avère beaucoup trop longue et occasionne chaque fois des coûts de plusieurs milliers de dollars.

30 Dans ce contexte, un phytodétecteur pouvant informer rapidement sur le niveau de toxicité de l'effluent de façon concordante avec les biotests "*Daphnia magna*" et "truite arc-en-ciel" devient un outil de gestion très intéressant pour l'industrie. Par une

intervention rapide et efficace, le détecteur de toxicité permettrait ainsi aux papetières de remédier au problème de toxicité aiguë de leurs effluents.

Le présent projet consiste à la réalisation et la validation d'un nouvel instrument de mesure de toxicité. Le détecteur se distingue des biotests conventionnels par l'emploi de matériel végétal (extrait mentionné précédemment) et par le fait que le
5 monitoring de l'effluent ou du poste industriel peut se faire en temps réel et en continu - à un coût plus élevé toutefois.

Une plante ne peut vivre sans lumière et l'on peut véritablement dire que l'appareil photosynthétique constitue le coeur de la plante. Le mécanisme visé est celui du transport d'électrons ayant lieu lors de la phase lumineuse de la photosynthèse.
10 L'avantage de se consacrer à une fonction primordiale pour l'organisme est double: i) nous avons une entrée sur le mécanisme d'action du toxique (avec possibilité de mesures quantitatives); ii) nous pouvons nous affranchir quelque peu de la biodiversité en ayant un indicateur toxique équivalent pour de nombreuses espèces (l'appareil photosynthétique s'étant conservé depuis des milliards d'années). Dans le cas qui
15 nous préoccupe, nous pouvons utiliser le transport de charge initié par la lumière dans des extraits provenant d'une très grande variété de végétaux, des cyanobactéries aux graminées en passant par les algues.

Aucun biotest reposant sur l'activité photosynthétique n'existe à ce jour. En ce qui concerne les biodétecteurs, quatre compagnies commercialisent des fluorimètres
20 portables spécialement conçus pour mesurer l'activité photosynthétique des plantes. Contrairement à ces dispositifs, mesurant les modulations de l'intensité de fluorescence (systèmes "PAM"), notre système mesure les courants de charges induits par la lumière (appelés photocourants). La technologie nécessaire à cette mesure est beaucoup moins dispendieuse que la technique fluorimétrique. De plus, le transfert de
25 charges induit par la lumière (TCIL) est un processus plus délocalisé que celui à la base de la fluorimétrie modulée. La technique préconisée jauge l'activité photosynthétique sur la membrane thylacoïdale au complet alors que la fluorimétrie modulée mesure l'activité au niveau d'un complexe protéique particulier, le PSII. Autant au niveau structurel qu'au niveau fonctionnel, notre sonde de toxicité vise des
30 plages mitoyennes, accroissant du même coup son "spectre d'action".

Le détecteur mesure le nombre d'électrons produits par une lumière d'intensité donnée. La valeur maximale du photocourant ($I_{p_{max}}$) obtenue après quelques secondes

est proportionnelle à l'activité photosynthétique des membranes. Si l'on porte $I_{p_{max}}$ en fonction de la concentration des inhibiteurs photosynthétiques (contaminants) présents dans la chambre de photoconversion, nous obtenons une sigmoïdale typique. Une estimation de la CI_{50} (voir glossaire) peut rapidement être faite.

En quelques lignes, le détecteur se compose d'une source lumineuse blanche,
5 d'une chambre où trempe deux électrodes (la chambre de photoconversion), d'un circuit électronique détectant les courants induits par la lumière (le module ampérométrique) et d'un système d'acquisition de données relié à un ordinateur. Le test de toxicité requiert la mise en contact de l'échantillon liquide avec la préparation extraite des plantes. Une fois le mélange introduit dans la chambre de
10 photoconversion, une illumination brève a lieu (moins d'une minute). Un courant électrique est ensuite mesuré par le module ampérométrique et son amplitude et la forme de ce courant dépendent de la présence de toxiques dans l'eau. L'appareil est conçu de telle sorte que de nombreux échantillons puissent être analysés simultanément. Plusieurs témoins permettent d'interpréter de manière non équivoque
15 l'effet des contaminants.

Les premiers photocourants mesurés dans les thylacoïdiennes furent réalisés grâce aux travaux d'Allen et ses collaborateurs au milieu des années 1970 (Allen & Crane, 1976). Des équipes en France et au Canada se sont efforcées de caractériser ce signal. Il s'est avéré que le transport d'électrons constituait une sonde fiable et
20 représentative de l'activité globale de la photosynthèse et, par conséquent, de l'état physiologique de la plante.

Le projet consiste à optimiser la technique pour en faire à la fois un bioessai de seconde génération et un biodétecteur (biosenseur). À ce titre, la plante (ou algue) entière ou un extrait membranaire peuvent être mis à profit afin de s'adapter aux
25 besoins d'une clientèle particulière. En parcourant l'examen des bioessais répertoriés par Environnement Canada (Keddy & coll., 1994), nous avons constaté que l'objectif de plusieurs tests était de cibler les secteurs les plus toxiques afin d'identifier les lieux qui doivent être soumis à une évaluation plus rigoureuse. L'établissement de formulations végétales spécialisées va directement dans ce sens.

30 Seul le biotest appelé Microtox^{MD} pourrait concurrencer le système que l'on propose. Le Microtox^{MD} (commercialisé par Azur Environmental) est un bioessai basé sur le phénomène de bioluminescence de la bactérie marine *Photobacterium phosphoreum*. Lorsque cette bactérie est exposée à des substances toxiques, la

quantité de lumière qu'elle émet est réduite proportionnellement à la toxicité de l'échantillon. Bien que ce biotest soit rapide et assez sensible, il comporte toutefois deux inconvénients majeurs: i) il est peu représentatif des milieux récepteurs (utilisation de bactéries marines nécessitant une forte salinité) (Keddy & coll., 1994); et ii) il montre une faible corrélation avec plusieurs substances toxiques présentes dans les effluents industriels (p. ex. halogènes organiques, phénols, acides résiniques, solides dissous) (Firth & Backman, 1990).

Contrairement au système Microtox™, le présent détecteur repose sur une fonction biologique quasi universelle et non pas sur une réaction biochimique bien précise. La conjonction de plusieurs chambres de photoconversion, ou l'utilisation séquentielle des formulations (extraits) dans une chambre unique, donnent au détecteur une flexibilité sans pareille.

Parmi les autres systèmes concurrents, mentionnons les tests aux sels de tétrazolium. Malheureusement, la toxicité intrinsèque des réactifs utilisés et le manque de simplicité de ces tests (coûts associés élevés) ne fournissent que peu d'espoir. Il demeure les kits de toxicité (Rotoxkit™, Algatoxkit™ et autres), peu coûteux, certes, mais imprécis et nécessitant des heures avant d'obtenir un résultat.

Le détecteur de toxicité que nous proposons se positionne avantageusement par sa rapidité (quelques minutes), sa sensibilité (bien au-delà des besoins actuels), et la possibilité d'identification de groupes de contaminants (substrats caractérisés et ajouts de révélateurs spécifiques). Le principe de la mesure du TCIL (transfert de charges induit par la lumière) ouvre vraiment de nouveaux horizons.

Glossaire :

Biodétecteur: Organisme vivant (ou extrait d'organisme), assemblé dans un dispositif ou non, servant à révéler la présence d'une substance ou d'un phénomène physicochimique.

Bioessai ou biotest: Procédure standardisée permettant de déterminer l'effet d'une variable environnementale ou d'une substance sur un organisme vivant.

CI₅₀: Concentration d'un inhibiteur réduisant de 50 % une fonction biologique (par rapport à un témoin ne contenant pas cet inhibiteur). La durée d'exposition doit être précisée: par exemple, une CI₅₀ pour un essai d'une durée de 72 h sera appelée "CI₅₀ (72 h)".

Élutriat: Solution aqueuse obtenue après avoir ajouté de l'eau à une substance solide (p. ex., sédiments, résidus ou boues de forage ou de dragage), avoir agité le mélange, et procédé à une filtration ou un traitement équivalent.

Lixiviat: Eau ou eau résiduaire qui a percolé, in situ, au travers d'une colonne de sol ou de déchets solides.

5 *Phytodétecteur*: Biodétecteur d'origine végétale.

Phytoessai: Bioessai d'origine végétale.

Toxicité létale aiguë: Potentiel ou capacité inhérents d'un produit à causer la mort des organismes expérimentaux pendant une brève durée d'exposition (par rapport à la durée de vie de l'espèce en cause) à un matériau expérimental.

10 La captation de polluants

Le bioassainissement des milieux aquatiques consiste en l'élimination des polluants de ces mêmes milieux. Le CHLOROFILTRE (bioaccumulateur) est une technique, basée sur un concept original, favorisant l'emprisonnement (l'accumulation) des molécules, circulant dans un bioréacteur. Après engorgement des filtres, ceux-ci
15 sont retirés du milieu et traités. Ce système a l'avantage d'éviter les problèmes associés à la dégradation partielle des polluants, susceptibles de générer des sous-produits également nuisibles. Le CHLOROFILTRE est également le nom que nous avons donné à l'extrait végétal.

Résumons, le CHLOROFILTRE capte les produits toxiques dans le milieu
20 aquatique. Son rôle est donc de retirer physiquement d'un plan d'eau des produits chimiques pouvant affecter les divers maillons de la chaîne alimentaire. La gamme des polluants visés est très large puisque la plupart des molécules affectant la photosynthèse peuvent être captées par le CHLOROFILTRE. Parmi les produits organiques, citons les herbicides, les insecticides, les fongicides, l'urée; parmi les
25 produits inorganiques, les ions et les métaux lourds. Plusieurs instances devraient donc être intéressées par ce concept. En agriculture et en pisciculture, le déversement d'eaux contaminées est routinier; il est facile d'envisager de positionner un bioréacteur à un endroit stratégique du champ ou encore dans un bassin de rejet. Il existe également une forte demande au niveau des bains de décantation des municipalités.
30 Le système de CHLOROFILTRE peut être utilisé en bout de chaîne pour retirer de faibles quantités de polluants spécifiques qui auraient échappé aux installations en place. Finalement, les industries métallurgiques et celles de pâtes et papiers font face

à des problèmes de réduction des contaminants. Ce système pourrait simplement s'ajouter aux méthodologies déjà utilisées.

En terme d'assainissement des lieux contaminés, nous devons dès le départ cerner les trois grands secteurs: les eaux douces, les sédiments en eaux douces et les sols. La technologie du **bioaccumulateur** vise principalement les toxiques en eau
5 douce.

En ce qui a trait à la décontamination des sédiments aqueux et des sols, plusieurs technologies sont déjà bien établies: traitement des sols contaminés par du mercure et biofiltration, traitement thermique des sols contaminés par des hydrocarbures légers, lessivage de sols contaminés, traitement physico-chimique des
10 sédiments contaminés, etc.

D'autres technologies s'adressent à la décontamination des eaux usées industrielles: presseur rotatif pour la déshydratation des boues, biofiltration avec le procédé BIOFOR®, biofiltration avec le procédé BIOCARBONE™, récupération des métaux lourds, bioréacteur à membrane ZÉNOGEM™, traitement de résidus huileux,
15 etc. Ces technologies s'adressent principalement dans le secteur des pâtes et papiers et elles requièrent une technologie lourde et adaptée spécifiquement aux installations en place. En outre, ces procédés ne conviennent guère aux applications sur le terrain (rejets au fleuve ou tributaires).

Ce que nous proposons est davantage une unité mobile sous forme d'un
20 bioréacteur; utilisant du matériel végétal comme capteur. Le Chlorofiltre se démarque nettement par sa grande versatilité et la possibilité d'utiliser le système en circuit fermé ou continu par un dispositif de pompage. Contrairement à nos concurrents directs, dont la technologie est sensible aux fluctuations du climat, le Chlorofiltre est extrêmement résistant aux variations de température.

25 La présente invention a été décrite en faisant appel à des versions spécifiques qui peuvent être modifiées aisément et à volonté, sans s'éloigner des enseignements de ce mémoire et sans déroger de l'esprit et du coeur de l'invention. Ces modifications sont évidemment sous la portée de l'invention, telle que définie par les revendications annexées.

Références

- Agalidis, I., Lutz, M., et Reiss-Husson, F. Binding of carotenoids on reaction centers from *Rhodospseudomonas spheroides* R 26. Biochim. Biophys. Acta. 1980, 589, 264.
- Allen, J.F., Bennet, K.E., Steinback, et Arntzen C.J. Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. Nature 1981, 291, 25-29.
- Allen MJ & Crane AE. (1976). *Null potential voltammetry - An approach to the study of plant photosystems*. Bioelectrochem. Bioenerg. 3, 84-91.
- Anderson, I.C., et Robertson, D.S. Role of carotenoids in protecting chlorophylls from photodestruction. Plant Physiol. 1960, 35, 531-534.
- Aronoff, S., et Mackinney, G. The photo-oxidation of chlorophyll. J. Am. Chem. Soc. 1943, 65, 956-958.
- Asada, K., et Takahashi, M. Protection and scavenging of active oxygen in photosynthesis: Photoinhibition. (Kyle, D.J., Osmond, C.B., Arntzen, C.J. eds) 1987, 227-287.
- Bassi, R., et Dainese, P. The role of light harvesting complex II and the minor chlorophyll a/b proteins in the organization of the photosystem II antenna system. Prog. Photosyn. Res. 1989, II, 209-216.
- Bilger, W., Björkman, O., et Thayer, S.S. Light-induced spectral absorbance changes in relation to photosynthesis and the epoxidation state of xanthophyll cycle components in cotton leaves. Plant Physiol. 1989, 91, 542-551.
- Bilger, W., et Björkman, O. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. Photosynth. Res. 1990, 25, 173-185.
- Bilger, W., et Schreiber, U. Chlorophyll luminescence as an indicator of stress-induced damage to the photosynthetic apparatus. Effects of heat-stress in isolated chloroplasts. Photosynth. Res. 1990, 25, 161-171.
- Braumann, T., Weber, G., et Grimme, L.H. Carotenoid and chlorophyll composition of light-harvesting and reaction center proteins of the thylakoid membrane. Photobiochem. Photobiophys. 1982, 4, 1-8
- Braumann, T., Gräpper, T.H., Damm, I., et Grimme, L.H. Function of chlorophylls and carotenoids in thylakoid membranes. Pigment bleaching in relation to PS-I and

- PS-II activity of subchloroplast particles prepared with digitonin. Advances in photosynthesis research, Vol. II (C. Sybesma Ed.) 1984, 137-140.
- Campos, J.L., Figueras, X., Pinol, M.T., Boronat, A., et Tuburcio, A.F. Carotenoid and conjugated polyamine levels as indicators of ultraviolet-C induced stress in *Arabidopsis thaliana*. Photochem. Photobiol. 1991, 53, 689-693.
- 5 Cogdell, R.J., Parson, W.W., et Kerr, M.A. The type, amount, location, and energy transfert properties of the carotenoid in reactio centers from *Rhodospseudomonas Spheroides*. Biochim. Biophys. Acta. 1976, 430, 83.
- Cogdell, R.J. Carotenoid-bacteriochlorophyll interactions. Springer Ser. Chem. Phys. 1985, 42, 62-66.
- 10 Cogdell, R.J., et Frank, H.A. How carotenoids function in photosynthetic bacteria. Biochim Biophys. Acta. 1987, 895, 63-79.
- Dashwood, R.H., Protection by chlorophyllin against the covalent binding of 2-amino- (IQ to rat liver DNA. *Carcinogenesis*. (1992) 13, 113-118.
- Day, D.A., Ryrie, I.J., et Fuad, N. Investigations of the role of the main light-harvesting
- 15 chlorophyll a/b protein complex in thylakoid membranes. Reconstitution of depleted membranes from intermetent-light-grown plants with the isolated complex. J. Cell Biol. 1984, 97, 163-172.
- Demeter, S., Neale, P.J., et Melis, A. Photoinhibition: impairment of the primary charge separation between P-680 and pheophytin in photosystem II of chloroplasts.
- 20 FEBS Lett. 1987, 214, 370-374.
- Demmig-Adams, B. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. Biochim. Biophys. Acta. 1990, 1020, 1-24.
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W. III, Huber, U., Neimanis, S., Winter, K., Krüger, A., Czygan, F.-C., Bilger, W., et Björkman, O. Inhibition of zeaxanthin formation
- 25 and of rapid changes in radiationless energy dissipation by dithiothreitol in spinach leaves and chloroplasts. Plant Physiol. 1990, 92, 293-301.
- Egorov, S.Y., et Krasnovsky, A.A. Jr. Participation of chlorophyll triplet state and singlet molecular oxygen in chloroplast photodestruction. Research in Photosynthesis Vol III (Murata, N. Ed.). 1992, 111-114.
- 30 Firth BK & Backman CJ. (1990). *Comparison of Microtox testing with rainbow trout (acute) and Ceriodaphnia (chronic) bioassays in mill wastewaters*. *Tappi Journal* 12/90, 169-174.

- Foote, C.S. Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems. Free Radical in Biology (Pryor, W.A. ed.), 1976, II, 85-133.
- Foots, C.S., Chang, Y.C., et Denny, R.W. Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection. J. Am. Chem. Soc. 1970, 92, 5216-5218.
- 5 Frank, H.A., Violette, C.A., Trautman, J.K., Shreve, A.P., Owens, T.G., Albrecht, A.C. Carotenoids in photosynthesis: structure and photochemistry. Pure Appl. Chem. 1991, 63, 109-114
- Frank, H.A., Farhoosh, R., DeCoster, B., et Christensen, R.L. Molecular feature that control the efficiency of carotenoid-to-chlorophyll energy transfer in
- 10 photosynthesis. Research in Photosynthesis Vol. I (Murata, N. Ed.) 1992, 125-128.
- Frank, H.A., Farhoosh, R., Aldema, M.L., DeCoster, B., Christensen, R.L., Gebhard, R., et ugenburg, J. Carotenoid-to-bacteriochlorophyll singlet energy transfer in carotenoid-incorporated B850 light-harvesting complexes of *Rhodobacter*
- 15 *spaeiroides* R-26.1. Photochem. Photobiol. 1993, 57, 49-55.
- Garab, G., Szito, T., et Faludi-Daniel, A. Organisation of pigments and pigment-protein complexes of thylakoids revealed by polarized light spectroscopy. The light reactions (Barber, J. ed.) 1987, 305-339.
- Gillbro, T., Cogdell, R.J., et Sundström, V. Energy transfer from carotenoid to
- 20 bacteriochlorophyll-a in the B800-820 antenna complex from *Rhodospseudomonas acidiphila* strain 7050. FEBS Lett. 1988, 235, 169-172.
- Gillbro, T., Andersson, P.O., Liu, R.S.H., Asato, A.E., Takaishi, S., et Cogdell, R.J. Location of the carotenoid 2Ag-state and its role in photosynthesis. Photochem. Photobiol. 1993, 57, 44-48.
- 25 Grams, G.W., et Eskins, K. Dye-sensitized photooxidation of tocopherols. Correlation between singlet oxygen reactivity and vitamin E activity. Biochemistry 1972, 11, 606-608.
- Green, B.R., Pichersky, E., et Kloppstech, K. Chlorophyll a/b-binding proteins: an extended family. Trends Biochem. Sci. 1991, 16, 181-186.
- 30 Grumbach, K. Interconversion of carotenoids and quinones after onset of photosynthesis in chloroplasts of higher plants. Z. Naturforsch. 1983, 38C, 393-398.

- Hager, A. The reversible, light-induced conversions in xanthophylls in the chloroplasts. Pigments in plants (F.C. Czygan Ed.) Fisher, Stuttgart, 1980, 57-79.
- Hayashi, H., Kolaczkoeski, S.V., Noguchi, T., Blanchard, D., et Atkinson, G.H. Picosecond time-resolved resonance Raman scattering and absorbance changes of carotenoids in light-harvesting systems of photosynthetic bacterium *Chromatium vinisum*. J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 4664-4670.
- 5 Hecht, SS. Chemoprevention by isothiocyanates. *J. Cell Biochem* (1995) 22, 195-209.
- Heller JG. (1995). *Étude économique de fond de l'industrie canadienne de la biotechnologie*. Environnement, Santé et Industrie Canada.
- Humbeck, K., Romer, S., et Senger, H. Evidence for an essential role of carotenoids in the assembly of an active photosystem II. Planta 1989, 179, 242-250.
- 10 Iwata, K., Hayashi, H. et Tasumi, M. Resonance Raman studies of the conformations of all-trans carotenoids in light-harvesting systems of photosynthetic bacteria. Biochim. Biophys. Acta. 1985, 810, 269.
- Kandaswami, C. et Middleton, E. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv. Exp. mEd. Biol.* 91994) 366, 351-376.
- 15 Keddy C, Greene JC & Bonnell MA. (1994). *Examen des biotests effectués sur des organismes entiers pour l'évaluation de la qualité des sols, des sédiments et des eaux douces au Canada*. Environnement Canada, 193 p.
- Kennedy, A. prevention of carcinogenesis by protease inhibitors. *Cancer Res.* (1994) 54, 1999-2005.
- 20 Khachik, F, Beecher, GR, et Smith, JC. Lutein, lycopene and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer. *J. Cell Biochem.* (1995) 22, 236-246.
- Khalyfa, A, Kermasha, S. et Alli, I. Extraction, purification and characterization of chlorophyll from spinach leaves. *J. Agric. Food chem.* (1992) 40, 215-220.
- 25 Kingma, H., van Grondelle, R., et Duysens, L.N.M. Magnetic-field effects in photosynthetic bacteria. I Magnetic-field-induced bacteriochlorophyll emission changes in the reaction center and the antenna of *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas sphaeroides* and *Prosthecochloris aestuarii*. Biochim. Biophys. Acta. 1985a, 808, 363-382.
- 30 Kingma, H., van Grondelle R., et Duysens, L.N.M. Magnetic-field effects in photosynthetic bacteria. II Formation of triplet states in the reaction center and the antenna of *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Biochim. Biophys. Acta. 1985b, 808 383-399.

- Kok, B., Gassner, E.B., et Rurainski, H.J. Photoinhibition of chloroplast reactions. Photochem. Photobiol. 1965, 4, 215-227.
- Kolubayev, T., Geacintov, N.E., Paillotin, G., et Breton, J. Domain size in chloroplasts and chlorophyll-protein complexes probed by fluorescence yield quenching induced by singlet-triplet exciton annihilation. Biochim. Biophys. Acta. 1985, 808, 66-76.
- 5 Kovacs T & O'Connor B. (1996). *Insights for toxicity-free pulp and paper mill effluents*. Rapport MR 331, PAPRICAN, 26 p.
- Koyama, Y., Kanaji, M., et Shimamura, T. Configurations of neurosporene isomers isolated from the reaction center and the light-harvesting complex of
- 10 *Rhodobacter spheroides* G1C. A resonance Raman, electronic absorption, and H-NMR study. Photochem. Photobiol. 1988, 48, 107-114.
- Koyama, Y. Natural selection of carotenoid configurations by the reaction center and light-harvesting complex of photosynthetic bacteria. Carotenoids: Chemistry and biology (ed. Krinsky, N.I.) 1990, 207-222.
- 15 Koyama, Y. Structures and functions of carotenoids in photosynthetic systems. J. Photochem. Photobiol. 1991, 9, 265-280.
- Kramer, H., et Mathis, P. Quantum yield and rate of formation of the carotenoid triplet state in photosynthetic structures. Biochim. Biophys. Acta. 1980, 593, 319-329.
- 20 Krinsky, N.I. Carotenoid protection against oxidation. Pure Appl. Chem. 1979, 51, 649-660.
- Levy, J., Bosin, E., Feldman, B., Giat, Y., Munster, A., Danilenko, M. et Sharoni, Y. Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either α -carotene et β -carotene. *Nutr. Cancer.* (1995), 24, 257-266.
- 25 Lichtenthaler, H.K., Prenzel, U., Douce, R., et Joyard, J. Localization of prenylquinones in the envelope of spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta. 1981, 641, 99-105.
- Lichtenthaler, H.K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic
- 30 biomembranes. Methods Enzymol. 1987, 148, 350-382
- Lutz, M., Kleo, J., et Reiss-Husson, F. Resonance Raman scattering of bacteriochlorophyll bacteriopheophytin and spheroidene in reaction centers of

- Rhodopseudomonas spheroides*. Biochem. Biophys. Res. Commn. 1976, 69, 711.
- Lutz, M., Agalidis, I., Hervo, G., Cogdell, R.J., et Reiss-Husson, F. On the state of carotenoids bound to reaction centers of photosynthetic bacteria: A resonance Raman study. Biochim. Biophys. Acta 1978, 503, 287.
- 5 Markwell, J.; Bruce, B.D.; et Keegstra, K. Isolation of a carotenoid-containing sub-membrane particle from the chloroplastic envelope outer membrane of pea (*Pisum sativum*). J. biol. Chem., 1992, 267, 13933-13937.
- Marshall, E. search for a killer : focus shifts from fat to hormones in special report on breast cancer. Science. (1993). 259, 618-621.
- 10 Mathis, P., Butler, W.L., et Satoh, K. Carotenoid triplet state and chlorophyll fluorescence quenching in chloroplasts and subchloroplast particles. Photochem. Photobiol. 1979, 30, 603-614.
- Mathis, P., Schenck, C.C. The functions of carotenoids in photosynthesis. Carotenoid Chemistry and Biochemistry (G. Britton et T.W. Goodwin Eds.) 1982, 339-347.
- 15 Matsushima-Nishiwaki, R. Shidoji, Y., Nishiwaki, S., Yamada, T. moriwaki, H., et Muto, Y. Suppression by carotenoids of microcystin-induced morphological changes in mouse hepatocytes. Lipids. (1995) 30, 1029-1034.
- McDanell, R., McLean, AEM, Hanly, AB, Heaney, RK et Fenwick, GR. Chemical and biological of indole glucosinates : a review. Food Chem. Toxicol. (1986). 26, 59-20 70.
- Miller, N. et Carpentier, R. Energy dissipation and photo-protection mechanisms during chlorophyll photobleaching in thylakoid membranes. Photochem. Photobiol. 1991, 54, 465-472.
- Miller RK & coll. (1995). *Sensors and instrumentation markets*. Ministère de l'Industrie, 25 du Commerce de la Science et Technologie. QIC A028461.
- Mimuro, M., et Kato, T. Carotenoids in photosynthesis: absorption, transfer and dissipation of light energy. Pure Appl. Chem. 1991, 63, 123-130.
- Monger, T.G., et Parson, W.W. Singlet-triplet fusion in *Rhodopseudomonas* sphaeroids chromatophores. A probe of the organization of the photosynthetic apparatus. Biochim. Biophys. Acta 1977, 460, 393-407.
- 30 Moore, A.L., Joy, A., Tom, R., Gust, D., Moore, T.A., Bensasson, R.V., et Land, E.J. Photoprotection of carotenoids during photosynthesis: Motional dependences of intramolecular energy transfer. Science 1982, 216, 982-984.

- Murakami, A., et Fujita, Y. Regulation of photosystem stoichiometry in the photosynthetic system of the cyanophyte *Synechocystis* PCC 6714 in response to light-intensity. Plant Cell Physiol. 1991, **32**, 223-230.
- Naruse, M., Hashimoto, H., Kuki, M., et Koyama, Y. Triplet excitation of precursors of spirilloxanthin bound of the chromatophores of *Rhodospirillum rubrum* as detected by transient Raman spectroscopy. J. Mol. Struct. 1991, **242**, 15-26.
- 5 Negishi, T., Arimoto, S., Nishizaki, C., et Hayatsu, H. inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-purido. *Carcinogenesis*. (1989). **10**, 145-149
- Nuijs, A.M., van Grondelle, R., Joppe, H.L.P., van Bochove, A.C., et Duysens, L.N.M. Singlet and triplet excited carotenoid and antenna bacteriochlorophyll of the photosynthetic purple bacteria *Rhodospirillum rubrum* as studies by picosecond absorption difference spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta. 1985, **810**, 94-105.
- 10 Nurmi, A.H. Alteration of thylakoid membrane structure in *Brassica rapa ssp. oleifera* during ageing in high and low light. Plant Cell Env. 1990, **13**, 305-317.
- 15 Owens, T.G., Shreve, A.P., et Albrecht, A.C. Dynamics and mechanism of singlet energy transfer between carotenoids and chlorophylls: light harvesting and non-photochemical fluorescence quenching. Research in Photosynthesis Vol.I (Murata, N., Ed.) 1992, 179-186.
- Pepkowitz, L.P. The stability of carotene in acetone and petroleum ether extracts of green vegetables. J. Biol. Chem. 1943, **149**, 465-471.
- 20 Peto, R., Doll, R., Buckley, J.D., et Sporn, M.B. Nature 1981, **290**, 201-???
- Picorel, R., Holt, R.E., Cotton, M., et Seibert Surface-enhanced resonance Raman scattering spectroscopy of bacterial photosynthetic membranes: the carotenoid of *Rhodospirillum rubrum*. J. Biol. Chem. 1988, **263**, 4374-4380.
- 25 Picorel, R., Bakhtiari, M., Lu, T., Cotton, T.M., et Seibert, M. Surface-enhanced resonance Raman scattering spectroscopy as a surface topography probe in plant photosynthetic membranes. Photochem. Photobiol. 1992, **56**, 263-270.
- Plumley, F.G., et Schmidt, G.W. Reconstitution of chlorophyll a/b light-harvesting complexes: xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. 1987, **84**, 146-150.
- 30 Powles, S.B. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. Ann. Rev. Plant Physiol. 1984, **35**, 15-44.

- Purcell, M. Étude comparative de la localisation tridimensionnelle des pigments photosynthétiques et de la distribution du flux des excitons au sein du photosystème I. Thèse de doctorat. 1993.
- Purcell M & Carpentier, R (1990). A phytotoxicity biosensor using photosynthetic membranes. *Water Poll. Res. J. Canada*. **25**, 175-185.
- 5 Purcell, M., et Carpentier, R. Homogeneous photobleaching of chlorophyll holochromes in a photosystem I reaction center complex. Photochem. Photobiol. 1994.
- Rice-Evans, CA, Miller, NJ, et Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol.* (1996) **20**, 933-956.
- 10 Rybek, JF. In Singlet O₂, polymers and biomolecules (1985) Vol. IV pp. 1-90.
- Sagar, A.D., et Briggs, W.R. Effects of high light stress on carotenoid-deficient chloroplasts in *Pisum sativum*. Plant Physiol. 1990, **94**, 1663-1670.
- Salisbury, F.B., et Ross, C.W. *Plant physiology*. 4th Ed. 1992
- Sandmann, G., Kuhn, M., et Boger, P. Carotenoids in photosynthesis: protection of D1 degradation in the light. Photosynthe. Res. 1993, **35**, 185-190.
- 15 Satoh, K. Mechanism of photoinactivation in photosynthetic systems. I. The dark reaction of photoinactivation. Plant Cell Physiol. 1970a, **11**, 15-27.
- Satoh, K. Mechanism of photoinactivation in photosynthetic systems. II. The occurrence and properties of two different types of photoinactivation. Plant Cell Physiol. 1970b, **11**, 29-38.
- 20 Satoh, K. Mechanism of photoinactivation in photosynthesis systems. III. Site and mode of photoinactivation in photosystem I. Plant Cell Physiol. 1970c, **11**, 187-197.
- Schrafferricht, H., et Junge, W. Analysis of the complex band spectrum of P700 based on photoselection studies with photosystem I particles. Photochem. Photobiol. 1981, **34**, 223-232.
- 25 Senger, H., et Straßberger, G. Development of photosystems in greening algae. Chloroplast development (G. Akoyunoglou Ed.) 1978, 367-378.
- Shreve, A.P., Trautman, J.K., Frank, H.A., Owens, T.G., et Albrecht, A.C. Femtosecond energy-transfer processes in the B800-850 light-harvesting complex of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. Biochim. Biophys. Acta. 1991, **1058**, 280-288.
- 30

- Siefermann-Harms, D. The xanthophyll cycle in higher plants. Lipids and lipid polymer in higher plants. (Tevini, M. et Lichtenthaler, H.K. eds.) 1977, 218-230.
- Siefermann-Harms, D. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. Physiol. Plant. 1987, 69, 561-568.
- 5 Siefermann-Harms, D. High-performance liquid chromatography of the chloroplast pigments. One-step separation of carotene and xanthophyll isomers, chlorophylls and pheophytins. J. Chromato. 1988, 448, 411-416.
- Siefermann-Harms, D. Protective function of the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll-a/b-protein complex in pigment photo-oxidation. J. Photochem. Photobiol. 1990, 4, 283-295.
- 10 Siström, W.R., Griffiths, M., et Stanier, R.Y. The biology of photosynthetic bacterium which lacks colored carotenoids. J. Cell. Comp. Physiol. 1956, 48, 473-515.
- Smith, E.L., et Pickels, E.G. The effect of detergents on the chlorophyll-protein compound of spinach as studied in the ultracentrifuge. J. Gen. Physiol. 1941, 24, 753-764.
- 15 Stravic, B. Role of chemopreventers in human diet. Clin. Biochem. (1994) 27, 319-332.
- Takaichi, S., Gardiner, A.T., et Cogdell, R.J. Pigment composition of light-harvesting pigment-protein complexes from *Rhodospseudomonas acidophila*: effect of light intensity. Research in Photosynthesis Vol I (Murata, N. Ed.) 1992, 149-152.
- 20 Thornber, J.P. Chlorophyll-proteins: light-harvesting and reaction center components of plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 1975, 26, 127-158.
- Trautman, J.K., Shreve, A.P., Violette, C.A., Frank, H.A., Owens, T.G., et Albrecht, A.C. Femtosecond dynamics of energy-transfer processes in the B800-850 light-harvesting complexes of *Rhodobacter sphaeroides*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87, 215-219.
- 25 Vierling, E., et Alberty, R.A. P700 chlorophyll a-protein. Purification, characterization and antibody preparation. Plant Physiol. 1983, 72, 625-633.
- Wattenberg, L.W. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. Cancer Res. (1992) 52, 2085-2091.
- 30 Wattenberg, L.W. Chemoprevention of cancer by naturally occurring and synthetic Compounds. In « Cancer chemoprevention » (1992).
- Wasielewski, M.R., Norris, J.R., Shipman, L.L., Lin, C.-P., Svec, W.A. Monomeric chlorophyll a enol: evidence for its possible role as the primary donor in

- photosystem I of plant photosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 1981, 78, 2957-2961.
- Werst, M., Jia, Y., Mets, L., et Fleming G.R. Energy transfer and trapping in the photosystem I core antenna. A temperature study. Biophys. J. 1992, 61, 868-878.
- 5 Wieckowski, S., et Majewska, G. Chlorophyll photobleaching in thylakoid membranes isolated from cucumber cotyledons at various stages of greening. J. Plant Physiol. 1990, 136, 701-704.
- Wilhelm, C., Kramer, P., et Lenartz-Weiler, I. The energy distribution between the photosystems and light-induced changes in the stoichiometry of system I and
- 10 II reaction centers in the chlorophyll b-containing alga *Mantoniella squamata* (Prasinophyceae). Photosynth. Res. 1989, 20, 221-233.
- Yamamoto, H.Y. Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants. Pure Appl. Chem. 1979, 51, 639-648.
- Young, A.J. The protective role of carotenoids in higher plants. Plant Physiol. 1991, 83,
- 15 702-708.
- Zhang, H., Huang, D. et Cramer, WA. Stoichiometrically bound B-carotene in the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis protects against oxygen damage. J. Biol. Chem. (1999), 274, 1581-1587.
-

Revendications:

1. Une méthode de préparation d'un extrait de plante comprenant des membranes thylacoïdiennes à composantes activables, ladite méthode comprenant :
- un conditionnement de la plante dans un environnement lumineux de longueur d'onde entre 220 nm et 500 nm, qui favorise l'excitation sélective d'un ou plusieurs pigments photosynthétiques; et optionnellement, un conditionnement de la plante dans des conditions sélectionnées parmi la sécheresse, l'hyperosmolarité, un traitement hormonal, la chaleur et le froid, qui permet l'enrichissement sélectif de la plante en constituants induits par lesdites conditions;
- 10 - la dispersion mécanique des constituants de la plante ou des tissus de cette plante, dans un milieu liquide permettant de conserver l'intégrité et la fonction des membranes thylacoïdiennes par le contrôle des paramètres suivants dans ledit milieu :
- une viscosité correspondant à environ 1 à 1.3,
 - 15 - une fluidité entre environ 0.5 et 5 poises,
 - un pH compris entre environ 6 et 8,
 - une température comprise entre environ 2 et 20°C, et
 - une hypertonie correspondant à environ 0.3 à 0.4 M de sucre;
- ladite dispersion mécanique conduisant à l'obtention d'un premier extrait
- 20 essentiellement constitué de membranes thylacoïdiennes, de débris cellulaires, et d'une phase liquide, lesdites membranes thylacoïdiennes comprenant des pigments photosynthétiques intègres.
2. Une méthode de préparation d'un extrait de plante comprenant des membranes thylacoïdiennes à composantes activables, ladite méthode comprenant :
- un conditionnement de la plante dans un environnement lumineux de longueur d'onde entre 500 nm et 600 nm, qui favorise le maintien des pigments photosynthétiques dans leur état fondamental, et optionnellement, un conditionnement de la plante dans des conditions sélectionnées parmi la sécheresse, l'hyperosmolarité,
 - 25 un traitement hormonal, la chaleur et le froid, qui permet l'enrichissement sélectif de la plante en constituants induits par lesdites conditions.
- la dispersion mécanique des constituants de la plante ou des tissus de cette plante, dans un milieu liquide permettant de conserver l'intégrité et la

fonction des membranes thylacoïdiennes par le contrôle des paramètres suivants dans ledit milieu :

- une viscosité correspondant à environ 1 à 1.3,
- une fluidité entre environ 0.5 et 5 poises,
- un pH compris entre environ 6 et 8,
- 5 - une hypertonicité correspondant à environ 0.3 à 0.4 M de sucre;

ladite dispersion mécanique conduisant à l'obtention d'un premier extrait essentiellement constitué de membranes thylacoïdiennes, de débris cellulaires, et d'une phase liquide, lesdites membranes thylacoïdiennes comprenant des pigments photosynthétiques dans un état fondamental, et activables.

10

3. La méthode de la revendication 1 comprenant l'étape ultérieure de séparation des membranes thylacoïdiennes des débris cellulaires et de la phase liquide, pour former un deuxième, un troisième et un quatrième extraits constitués essentiellement de membranes thylacoïdiennes, de débris cellulaires et de la phase
15 liquide, respectivement.

4. La méthode de la revendication 2 comprenant l'étape ultérieure de séparation des membranes thylacoïdiennes des débris cellulaires et de la phase liquide, pour former un deuxième, un troisième et un quatrième extraits constitués
20 essentiellement de membranes thylacoïdiennes, de débris cellulaires et de la phase liquide, respectivement.

5. La méthode de la revendication 3, comprenant l'étape ultérieure d'élimination rapide du taux d'humidité dudit deuxième extrait de façon à retirer l'eau
25 comme donneur d'électrons et à stabiliser lesdits pigments photosynthétiques dans leur état fondamental.

6. La méthode de la revendication 4, comprenant l'étape ultérieure d'élimination rapide du taux d'humidité dudit deuxième extrait de façon à retirer l'eau
30 comme donneur d'électrons et à stabiliser lesdits pigments photosynthétiques dans leur état fondamental.

7. La méthode de la revendication 5 ou 6 dans laquelle l'étape de réduction rapide du taux d'humidité est effectuée en congélation et sous vide.

8. Un extrait résultant de la mise en oeuvre du procédé de la revendication 1.

5

10. Un extrait résultant de la mise en oeuvre du procédé de la revendication 2.

11. Un extrait résultant de la mise en oeuvre du procédé de la revendication 3 ou 5.

10

12. Un extrait résultant de la mise en oeuvre du procédé de la revendication 4.

13. Un extrait résultant de la mise en oeuvre du procédé de la revendication 6.

15

14. L'utilisation du deuxième extrait résultant de la mise en oeuvre du procédé de la revendication 4 comme capteur de radicaux libres.

20

15. L'utilisation du deuxième extrait résultant de la mise en oeuvre du procédé de la revendication 13 comme capteur de radicaux libres.

16. L'utilisation de la revendication 15 qui comprend une étape de réhydratation dudit extrait.

25

17. L'utilisation de la revendication 14, 15 ou 16 dans laquelle ledit extrait comprend des chlorophylles à l'état singulet et des caroténoïdes à l'état fondamental.

18. L'utilisation de l'une quelconque des revendications 14 à 17, résultant en le traitement ou la prévention des maladies ou désordres médiés par la formation des radicaux libres.

30

- 62 -

19. L'utilisation de la revendication 18, dans laquelle lesdites maladies ou désordres ont une étiologie reliée à l'inflammation, le cancer ou le contact avec des irradiations.

20. L'utilisation de la revendication 19, dans laquelle les radiations sont des
5 radiations dans le spectre ultraviolet.

21. Une composition de matières qui comprend un extrait selon l'une quelconque des revendications 8 à 13.

10 22. Un dispositif qui comprend un extrait selon l'une quelconque des revendications 8 à 13.

ABSTRACT OF THE INVENTION

Cette invention concerne un procédé de préparation d'extraits de plantes, qui comprennent des pigments synthétiques dans leur environnement membranaire (membranes thylacoïdiennes). Ces extraits sont actifs ou activables. Les extraits
5 peuvent être stabilisés en leur retirant rapidement leurs molécules d'eau, auquel cas on peut les conserver pendant plusieurs mois. Ils sont activables une fois réhydratés. Le procédé comprend une première étape de conditionnement lumineux de la plante, idéalement entre 500 et 600 nm pour garder les pigments dans leur état
10 fondamental (non excités). Il comprend aussi une deuxième étape de dispersion mécanique des tissus de la plante dans un tampon permettant de garder associés les pigments dans leur environnement membranaire, en sélectionnant des paramètres de viscosité, fluidité, d'hypertonie, de température et de pH adéquats. Les membranes thylacoïdiennes sont ensuite soumises à une troisième étape de séparation du reste
15 des constituants de la plante, ce qui conduit à l'obtention d'un gâteau, utilisable immédiatement ou à lyophiliser pour usage futur. Les extraits sont utiles entre autres pour la capture de radicaux libres, qui sont reliés à l'inflammation, au cancer ou aux irradiations, notamment dans l'ultra-violet.

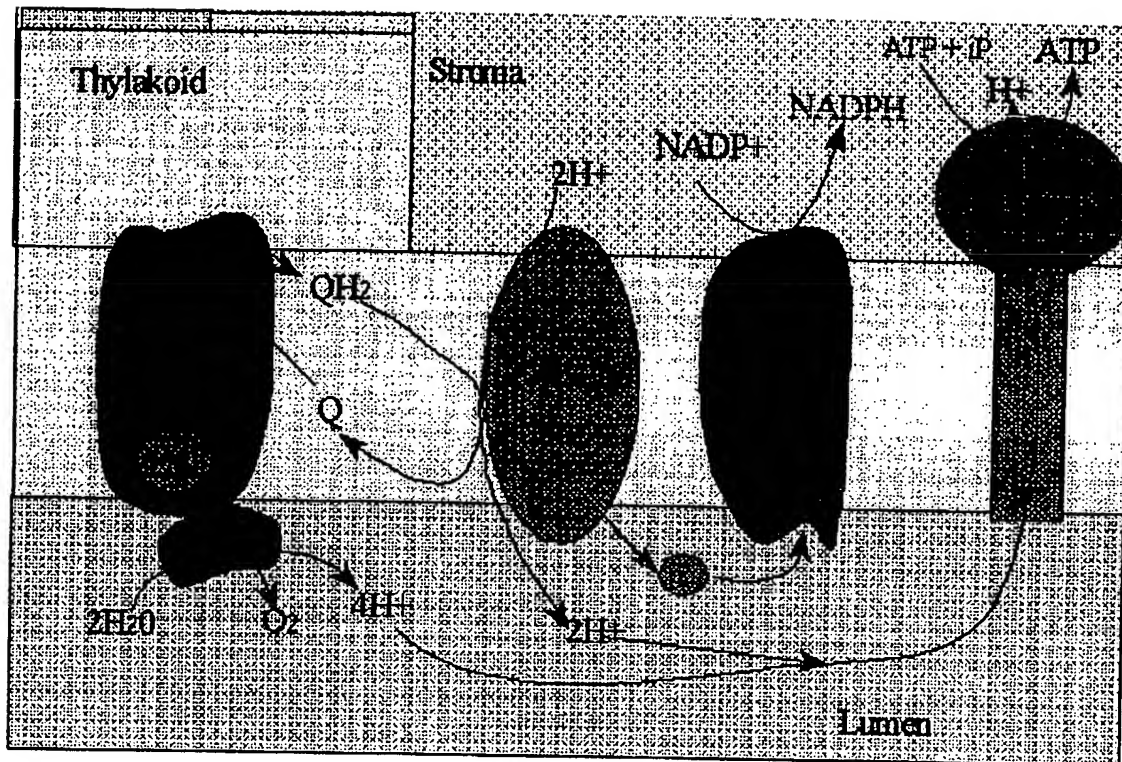


FIGURE 1

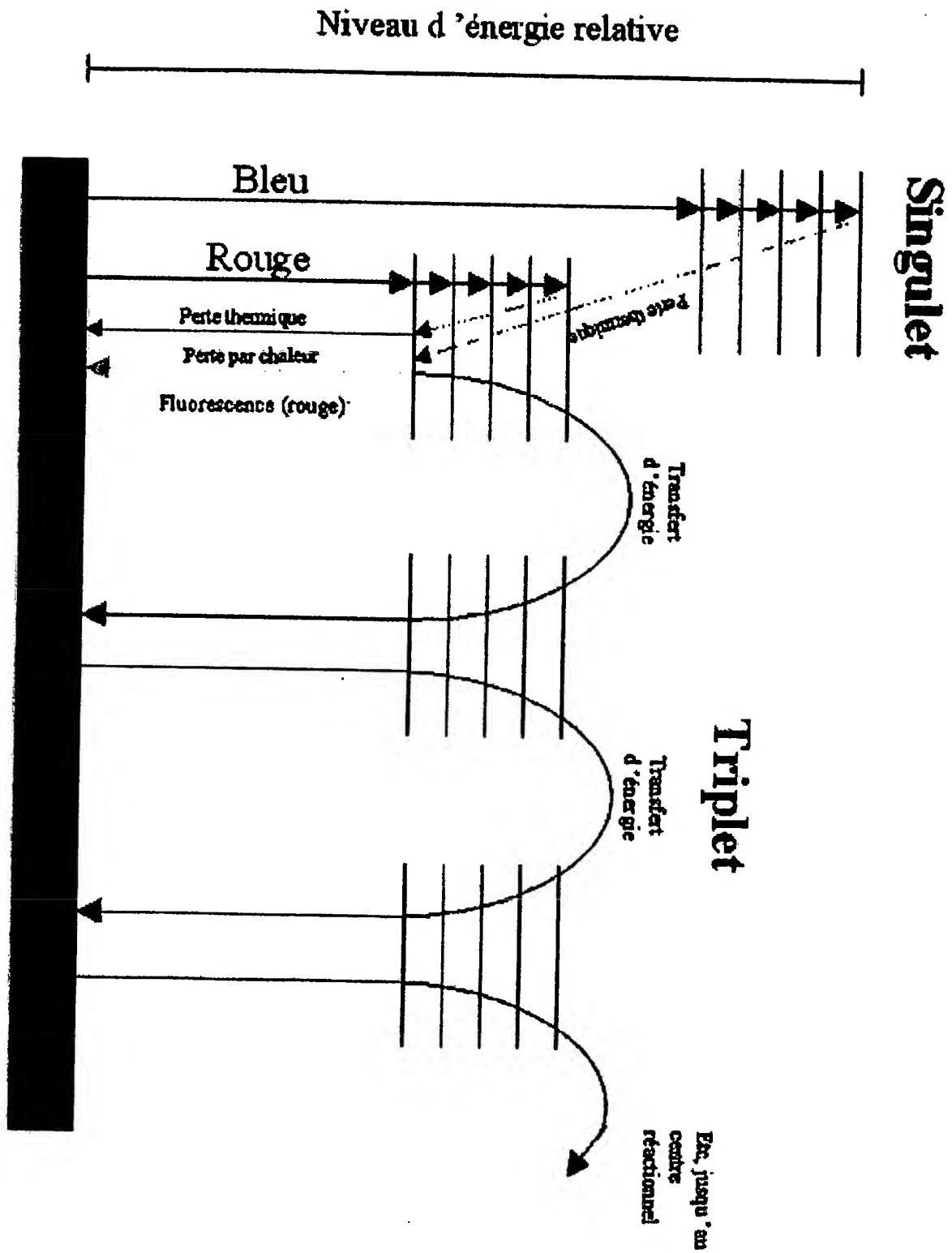


FIGURE 2

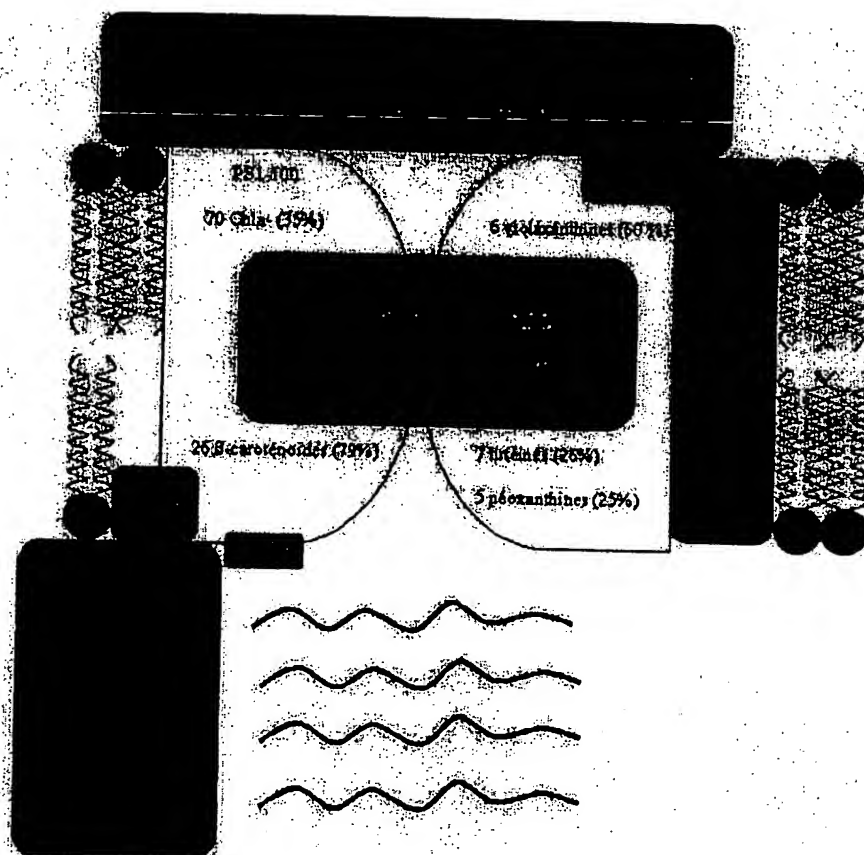


FIGURE 3

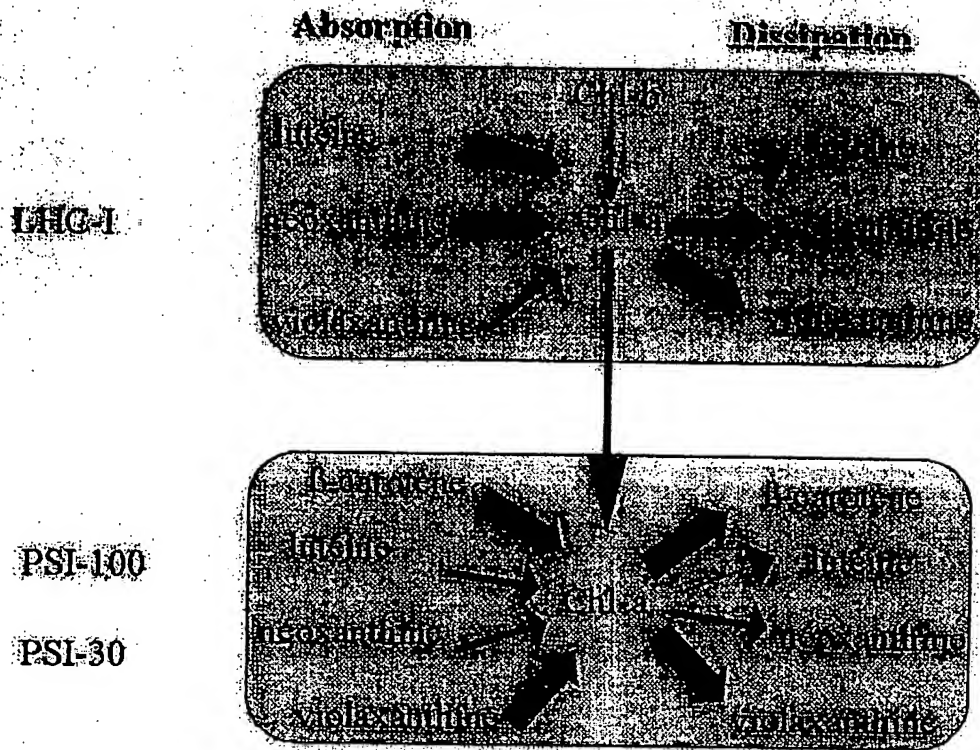


FIGURE 4

Séparation des différentes phases de l'extrait actif

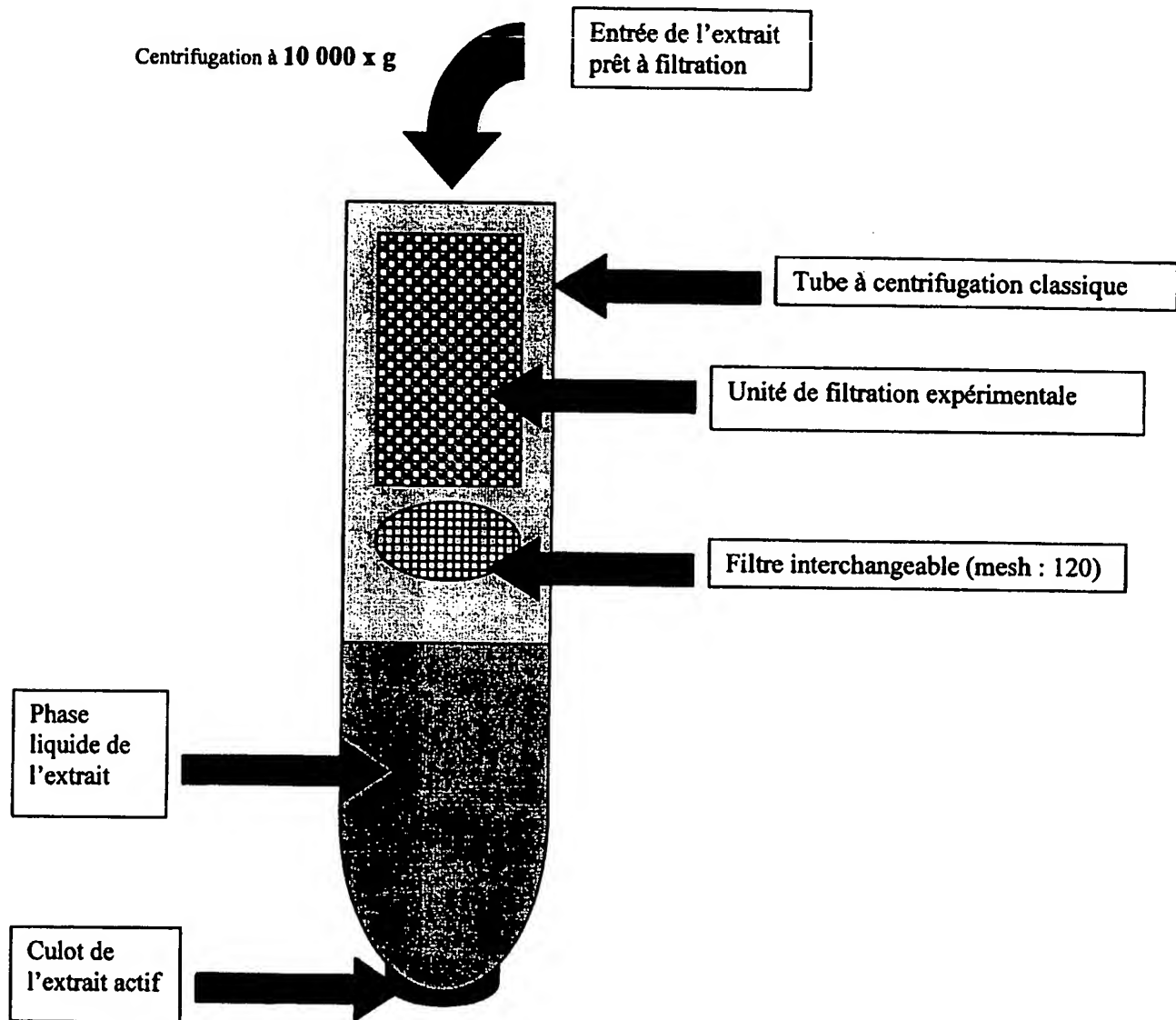


FIGURE 5

Optimisation des conditons de centrifugation

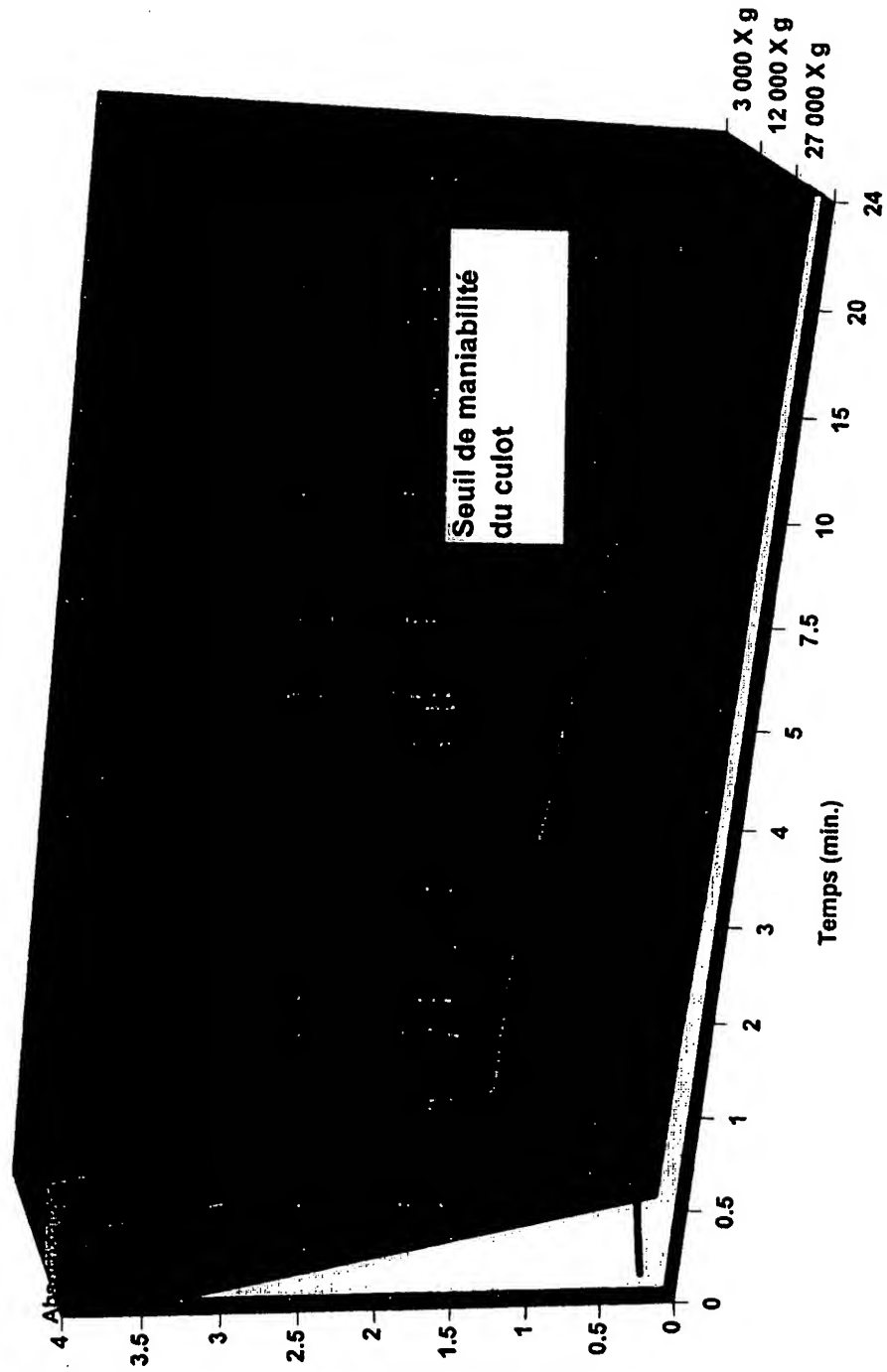


FIGURE 6

Courbe Standard de l'absorbance du DCIP avec PSII

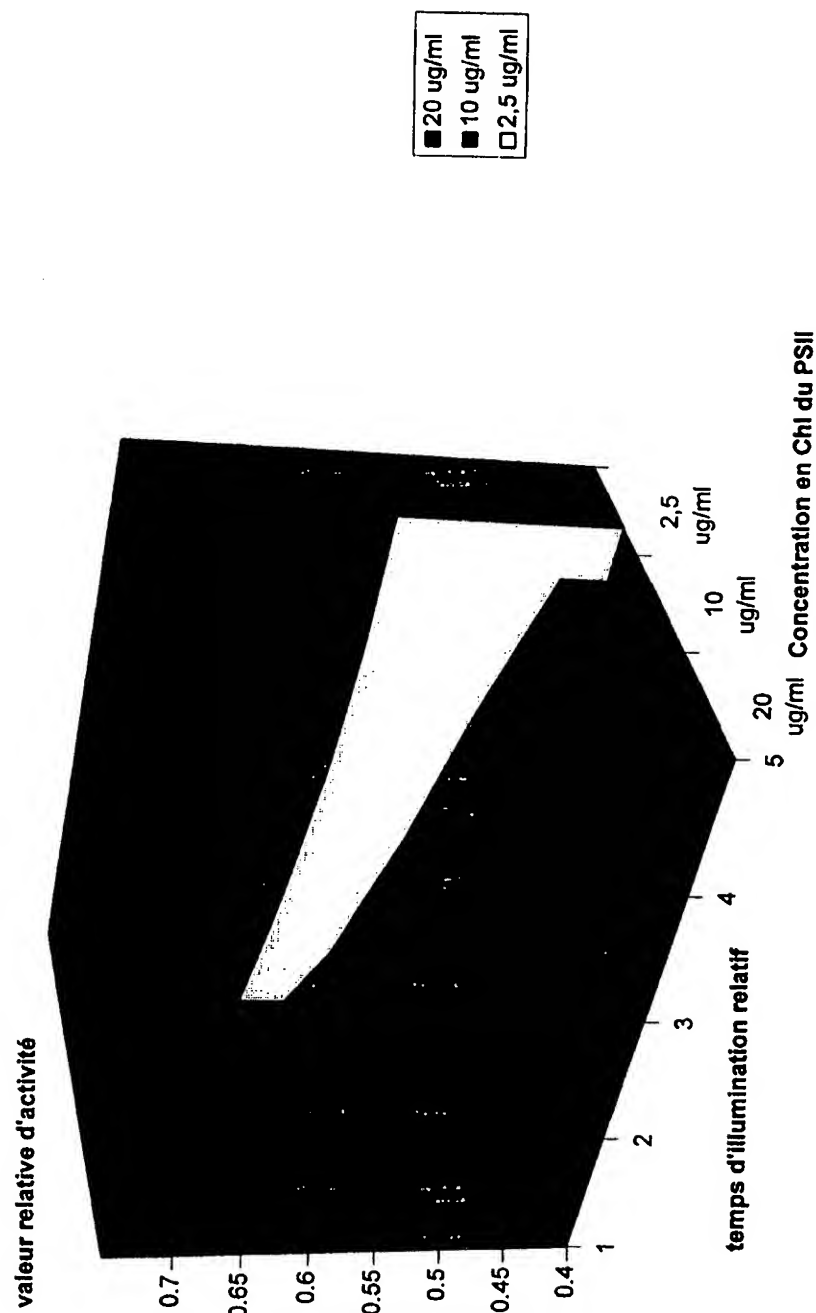


FIGURE 7

Activité des Produits PureCell

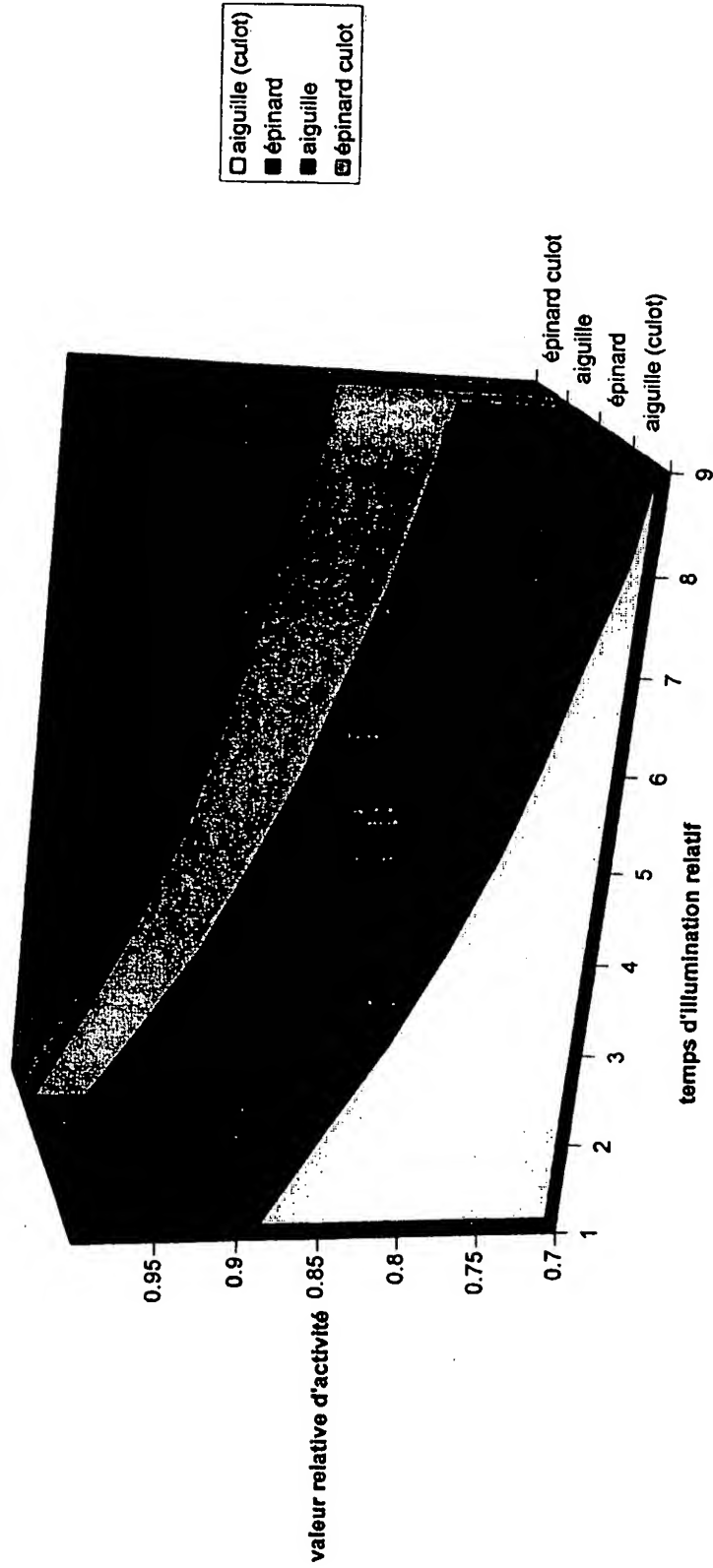


FIGURE 8

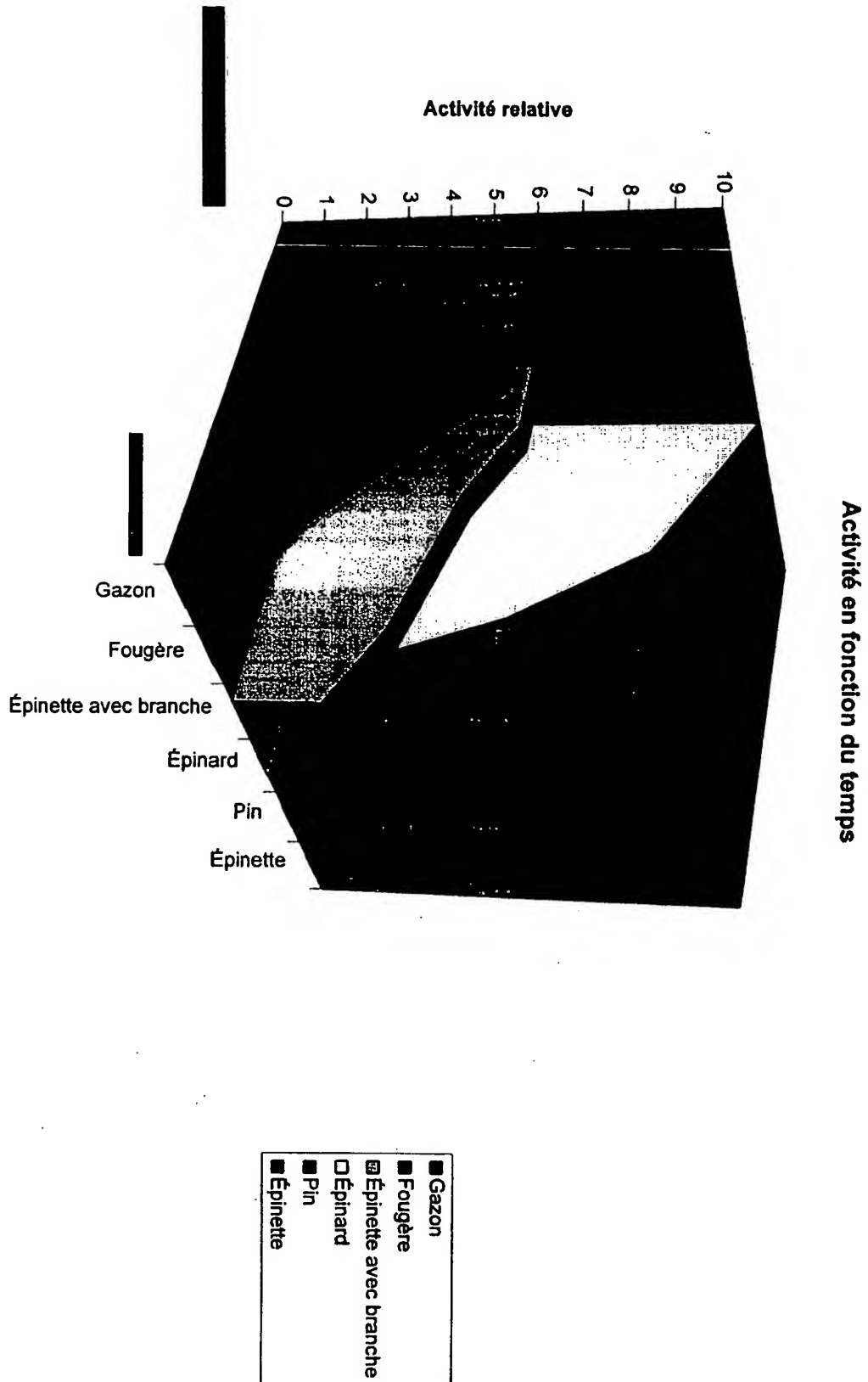
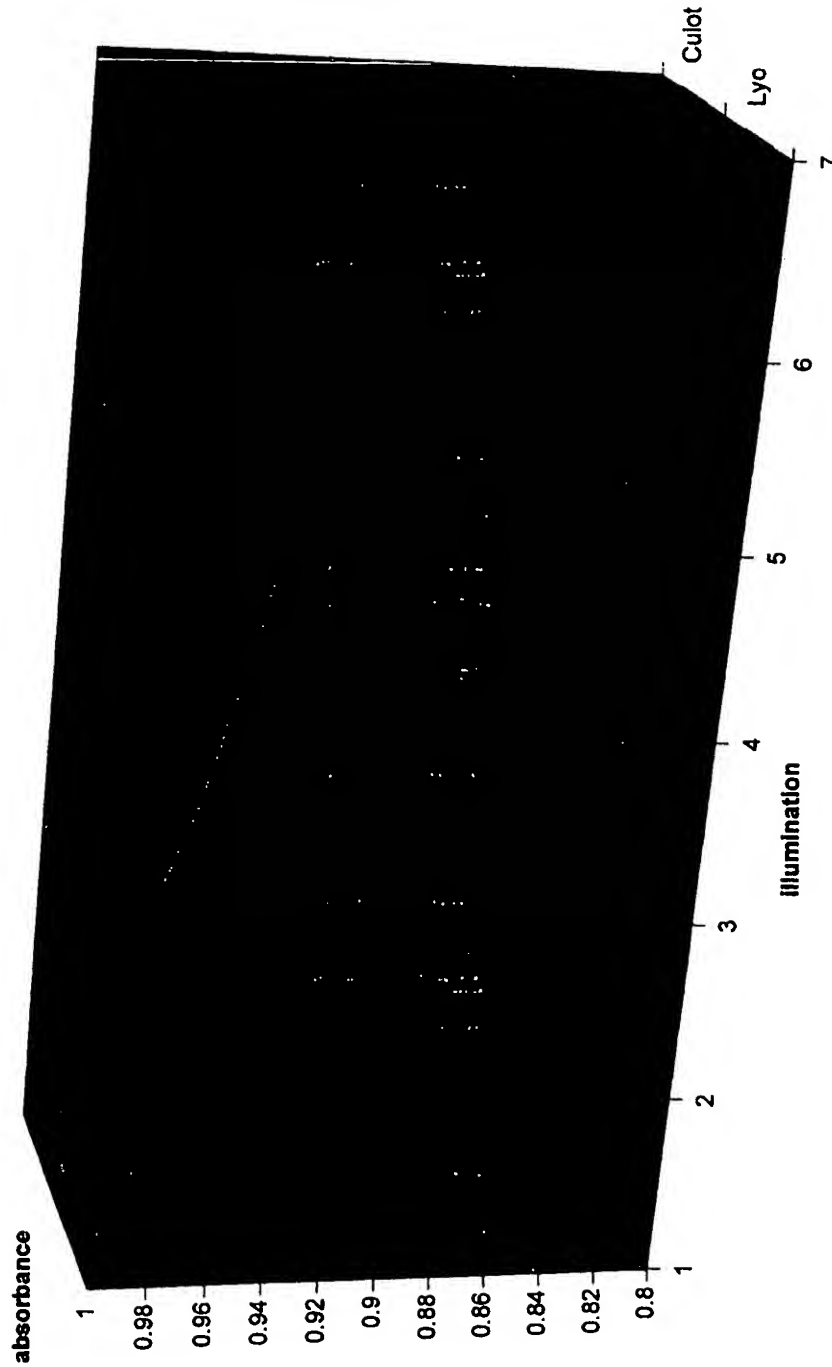


FIGURE 9

Activité du Gazon



■ Lyo
■ Culot

FIGURE 10

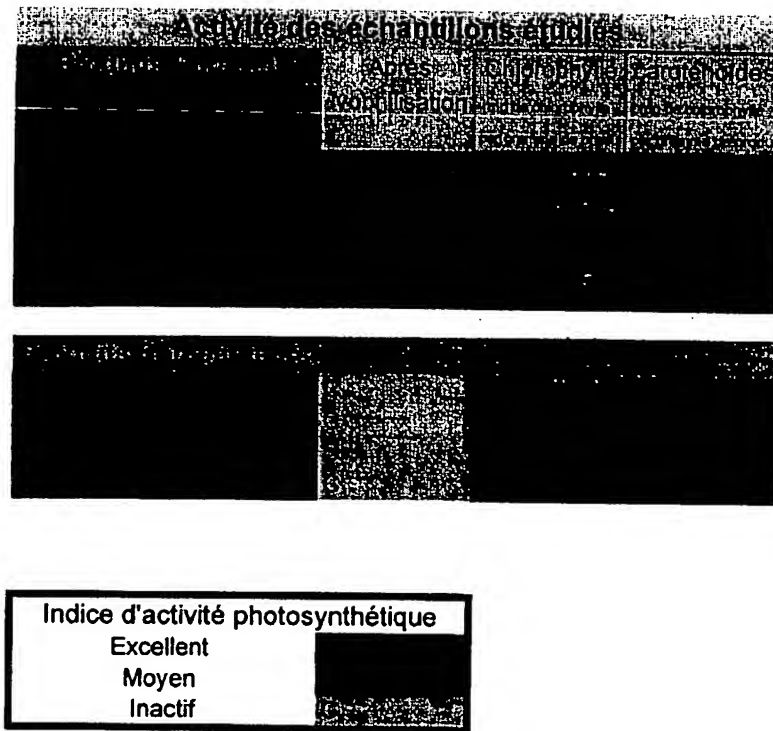
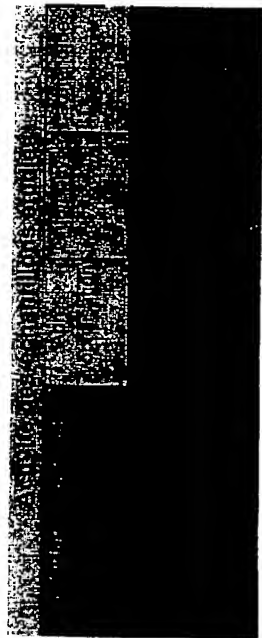


FIGURE 11



Indice d'activité photosynthétique	
Excellent	
Moyen	
Inactif	